

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Untersuchungen zum Organotropismus und zum oralen
Infektionsweg bei experimentellen *Mycoplasma suis*-Infektionen
des Schweines

von Sarah Lena Wentzel

aus Hamburg

München 2017

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Krankheiten des Schweines

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

Mitbetreuung durch: Univ.-Prof. Dr. Walter Hermanns

Dr. Julia Stadler

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Walter Hermanns

Tag der Promotion: 11.02.2017

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Geschichtlicher Überblick	3
2.	Taxonomie von <i>M. suis</i>	3
3.	Morphologie und Mikrobielle Eigenschaften von <i>M. suis</i>	6
4.	Pathogenese und Immunologie der <i>M. suis</i>-Infektion	8
4.1.	Adhäsion und Invasion von <i>M. suis</i>	8
4.2.	Immunologie der <i>M. suis</i> -Infektion.....	10
4.3.	Eingriff von <i>M. suis</i> in den Zellstoffwechsel	11
4.4.	Induktion der Eryptose	12
4.5.	Endothelschädigung durch <i>M. suis</i>	13
5.	Übertragungswege.....	13
6.	Zoonosepotential hämotropher Mykoplasmen.....	15
7.	Klinisches Erscheinungsbild einer <i>M. suis</i>-Infektion.....	16
7.1.	Klinisches Erscheinungsbild beim Saugferkel	16
7.2.	Klinisches Erscheinungsbild beim Absetzferkel, Läufer und Mastschwein	17
7.3.	Klinisches Erscheinungsbild bei der Sau	17
7.4.	Klinisches Erscheinungsbild beim experimentell infizierten Schwein	18
8.	Pathologisch-anatomisches und histopathologisches Bild	19
9.	Diagnostik	20
9.1.	Klinische Diagnose	20
9.2.	Hämatologische und klinisch-chemische Veränderungen	20
9.3.	Mikroskopischer Erregernachweis	21
9.4.	ELISA.....	22
9.5.	Polymerase chain reaction (PCR) und quantitative real-time PCR.....	24
9.6.	Immunhistochemischer Nachweis und In-Situ-Hybridisierung	25
9.7.	Kultivierung von <i>M. suis</i>	26
10.	Therapie und Prophylaxe	27

III.	MATERIAL UND METHODEN	29
1.	Tierversuch	29
1.1.	Versuchstiere	29
1.2.	Versuchsüberblick	29
1.3.	Splenektomie	30
1.4.	Infektion	31
1.5.	Klinische Untersuchung	31
1.6.	Probenentnahme	32
1.6.1.	Blutprobenentnahme	32
1.6.2.	Pathologische Untersuchung und Probenentnahme	32
2.	Probenbearbeitung.....	33
2.1.	Mikroskopische Untersuchung der Blutaussstriche.....	33
2.2.	Hämatologische Untersuchungen.....	33
2.3.	Klinisch-chemische Blutuntersuchungen.....	34
2.4.	<i>M. suis</i> -spezifische quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion.....	34
2.5.	Histopathologische Untersuchung	37
2.5.1.	Einbettungsverfahren	37
2.5.2.	Anfertigung und Färbung der Paraffinschnitte.....	38
2.5.3.	Anfertigung und Färbung der Kunststoffschnitte.....	39
2.6.	Immunhistochemie	40
2.7.	Anfertigung der pathologisch-anatomischen und histo- pathologischen Abbildungen	42
2.8.	Statistische Auswertung	42
IV.	ERGEBNISSE	43
1.	Klinische Untersuchung.....	43
1.1.	Splenektomierte, subkutan infizierte Tiere (Gruppe I)	43
1.2.	Splenektomierte, oral infizierte Tiere (Gruppe II)	47
2.	<i>M. suis</i>-Konzentration im Blut.....	47
2.1.	Quantitative Analyse	47
2.2.	Splenektomierte, subkutan infizierte Tiere (Gruppe I)	47
2.3.	Splenektomierte, oral infizierte Tiere (Gruppe II)	50
2.4.	Mikroskopischer Erregernachweis	50
2.4.1.	Splenektomierte, subkutan infizierte Tiere (Gruppe I)	50

2.4.2.	Splenektomierte, oral infizierte Tiere (Gruppe II)	50
3.	Verlauf der hämatologischen Parameter	50
3.1.	Splenektomierte, subkutan infizierte Tiere (Gruppe I)	50
3.2.	Splenektomierte, oral infizierte Tiere (Gruppe II)	53
4.	Verlauf der klinisch-chemischen Parameter	56
4.1.	Splenektomierte, subkutan infizierte Tiere	56
4.2.	Splenektomierte, oral infizierte Tiere.....	63
5.	Pathologisch-anatomische Untersuchung	66
6.	Histopathologische Untersuchung	69
7.	Nachweis von <i>M. suis</i> in Organen.....	75
7.1.	Ergebnisse der PCR.....	75
7.2.	Mikroskopischer Erregernachweis in nach Giemsa gefärbten Kunststoffschnitten.....	77
7.3.	Ergebnisse der Immunhistochemie	80
V.	DISKUSSION	83
1.	Verlauf der Infektion mit dem <i>M. suis</i>-Feldstamm K323/13 nach parenteraler Infektion.....	84
1.1.	Klinischer Verlauf der <i>M. suis</i> -Infektion	84
1.2.	Verlauf der <i>M. suis</i> -Bakteriämie	87
1.3.	Auswirkungen der <i>M. suis</i> -Infektion auf die untersuchten Blutparameter	88
1.4.	Pathologische und histopathologische Veränderungen.....	93
2.	Verteilungsmuster von <i>M. suis</i> in den Organen	98
3.	Übertragung von <i>M. suis</i> durch die orale Aufnahme erregerehaltigen Blutes	100
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	105
VII.	SUMMARY.....	107
VIII.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	109
IX.	TABELLENVERZEICHNIS	112
X.	LITERATURVERZEICHNIS	113

XI.	ANHANG	129
1.	Bewertungsschema („Score-System“) für die klinische Untersuchung ..	129
2.	Probenentnahmeprotokoll der pathologischen Unter- suchung.....	129
3.	Fixationsmedium	131
3.1.	Paraformaldehyd, 4%ig	131
4.	Lösungen für die Kunststoffeinfettung.....	131
4.1.	Spüllösung	131
4.2.	Einbettungsmedium.....	131
5.	Lösungen für die Färbung der Paraffinschnitte	132
5.1.	70%iges Ethanol.....	132
5.2.	Hämalaun-Eosin-Färbung	132
5.2.1.	1%ige HCl-Ethanol-Lösung	132
5.2.2.	0,5%ige HCl-Ethanol-Lösung	132
5.2.3.	1%ige Eosin-Lösung	132
6.	Lösungen für die Färbung der Kunststoffsnitte.....	132
6.1.	Hämalaun-Eosin-Phloxin-Färbung	132
6.1.1.	1%ige HCl-Ethanol-Lösung	132
6.1.2.	Stammlösung Eosin.....	132
6.1.3.	Stammlösung Phloxin	132
6.1.4.	Eosin-Phloxin-Gebrauchslösung	132
6.2.	Färbung nach Giemsa.....	133
6.2.1.	7%ige Giemsa-Gebrauchslösung	133
6.2.2.	0,5%ige Essigsäure.....	133
7.	Lösungen für die Immunhistochemie	133
7.1.	10 mM Citratpuffer pH 6,0	133
7.2.	0,05 M Tris-Buffered Saline (TBS) pH 7,6	133
7.3.	1%ige Wasserstoffperoxidlösung.....	133
7.4.	H ₂ O ₂ -DAB-Gebrauchslösung.....	133
8.	Lösungen für die Färbung mit Acridinorange	134
8.1.	Acridinorange-Stammlösung	134
8.2.	Acridinorange-Gebrauchslösung.....	134

9.	Geräte	134
XII.	DANKSAGUNG	136

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABC-Transporter	ATP-Binding Cassette Transporter
AIHA	Autoimmune Hemolytic Anemia
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	Aqua destillata
AST	Aspartat-Aminotransferase
CK	Kreatinkinase
CMt	<i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i>
DIC	Disseminated Intravascular Coagulation
DNA	Desoxyribonucleic acid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECF-Transporter	Energy-Coupling Factor Transporter
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GALT	Gut-associated Lymphoid Tissue
GAPDH	Glyceralaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GLDH	Glutamatdehydrogenase
HCl	Chlorwasserstoff
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HspA1	Heat shock Protein 1
IAP	Infectious Anemia of Pigs
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IHC	Immunohistochemistry
ISH	In Situ Hybridisation
kb	Kilobasenpaare
KGW	Körpergewicht
LT	Lebenstag
<i>M. suis</i>	<i>Mycoplasma suis</i>
MCH	Mean Corpuscular Hemoglobin
MCHC	Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration
MCV	Mean Corpuscular Volume
MIA	Multiplex Microbead Immunoassay
MSG1	<i>M. suis</i> GADPH like Protein
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADP/NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
p. i.	<i>post infectionem</i>

p. p.	<i>post partum</i>
PAECs	Porcine Aortic Endothelial Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleic acid
rnpB	RNase P RNA Gen
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid
SD	Standard Deviation
SEM	Standard Error of the Mean
<i>spp.</i>	Spezies
ZNS	Zentrales Nervensystem
γ -GT	Gamma-Glutamyltransferase

I. EINLEITUNG

Das durch eine Infektion mit *Mycoplasma suis* (*M. suis*) hervorgerufene Krankheitsbild wird als infektiöse Anämie des Schweines (IAP) bezeichnet und stellt die wichtigste hämolytische Anämie beim Schwein dar (HEINRITZI, 1990b). Da es sich bei der IAP um eine Faktorenkrankheit handelt, kann es in Abhängigkeit von der Virulenz des Erregerstammes, der Infektionsdosis sowie der Empfänglichkeit des Einzeltieres zu sehr unterschiedlichen Krankheitsverläufen kommen (SPLITTER, 1951; HEINRITZI, 1989; HOELZLE, 2008). Diese reichen von latent verlaufenden Infektionen bis hin zu akuten, von hochgradiger Iktereanämie gekennzeichneten Krankheitsanfällen (HEINRITZI, 1989; MESSICK, 2004). *Mycoplasma suis*-Infektionen treten weltweit bei allen Alters- und Nutzungsgruppen auf und verursachen erhebliche wirtschaftliche Verluste in der Schweinehaltung (RITZMANN et al., 2009; HOELZLE et al., 2011; THACKER und MINION, 2012).

Die Übertragung von *M. suis* erfolgt nach heutigem Wissensstand vorwiegend hämatogen von Tier zu Tier, am häufigsten iatrogen im Rahmen von zootechnischen Maßnahmen oder durch verunreinigte Kanülen, aber auch durch kleinere Verletzungen und Rangkämpfe (HENRY, 1979; HEINRITZI, 1992; HOELZLE et al., 2011). Experimentell konnte zusätzlich die Übertragung durch blutsaugende Arthropoden nachgewiesen werden (HEINRITZI, 1992; PRULLAGE et al., 1993). Auch die Möglichkeit der intrauterinen Übertragung von *M. suis* ist in der Literatur beschrieben (BERRIER und GOUGE, 1954; PRESTON und GREVE, 1965; CLAXTON und KUNESH, 1975; HENDERSON et al., 1997). HEINRITZI (1992) beschreibt außerdem die Übertragung von *M. suis* durch die orale Aufnahme erregerehaltigen Blutes. Diese Untersuchung basierte allerdings auf einem mikroskopischen Erregernachweis. Dieser zeichnet sich durch eine niedrige Spezifität und Sensitivität aus, eine sichere Diagnose ist erst ab einer hohen Erregeranzahl im Blut (10^6 *M. suis*/ml Blut) möglich (RITZMANN et al., 2009). In neuen, auf molekularen Methoden basierenden Untersuchungen konnte *M. suis*-DNA im Urin, Speichel, Nasen- und Vaginalsekret infizierter Tiere nachgewiesen werden (DIETZ et al., 2014). Somit erscheinen weitere, blutunabhängige Übertragungswege denkbar.

M. suis gehört zur Gruppe der unkultivierbaren hämotrophen Mykoplasmen (Hämoplasmen), welche sich vornehmlich durch die starke Adaptation an ihre Wirtszelle Erythrozyt von anderen Mykoplasmenarten unterscheiden (HOELZLE, 2008). In einer neueren Untersuchung mit dem hochinvasiven *M. suis*-Stamm KI3806 konnte erstmals mittels Immunhistochemie und Elektronenmikroskopie eine direkte Interaktion von *M. suis* mit den Endothelzellen der Blutgefäße infizierter Tiere festgestellt und diese somit als weitere Wirtszelle identifiziert werden (SOKOLI et al., 2013). Diese Entdeckung in Verbindung mit den in der Untersuchung von GLONEGGER-REICHERT (2015) festgestellten hohen Erregermengen in verschiedenen Organen (Großhirn, Kleinhirn, Leber) und der bekannten Chronizität von Hämoplasmen-Infektionen lässt die Vermutung zu, dass potentiell noch weitere Wirtszellen bzw. eine Sequestration des Erregers im Gewebe vorliegen könnte. Für die hämotrophe Mykoplasmenart *Candidatus Mycoplasma turicensis* konnte diese bereits nachgewiesen werden (NOVACCO et al., 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Verteilungsmuster von *M. suis* im Körper sowie innerhalb verschiedener Organe hinsichtlich potentieller weiterer Wirtszellen und einer damit verbundenen Sequestration in Organen evaluiert. Zusätzlich wurde die Infektion mit dem *M. suis*-Feldstamm K323/13 unter Betrachtung der klinischen, hämatologischen, pathologischen und histopathologischen Veränderungen im zeitlichen Verlauf dargestellt und die Möglichkeit der Übertragung von *M. suis* durch die orale Aufnahme erregerhaltigen Blutes untersucht.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Geschichtlicher Überblick

Im Jahr 1928 wurden erstmals kokkenähnliche, scheibenförmige, in Kolonien auf den Erythrozyten liegende Gebilde in Blutaussstrichen splenektomierter Mäuse beschrieben (SCHILLING, 1928). Aufgrund der Ähnlichkeit mit Protozoen (oberflächliche Lage, kokkenähnliches Aussehen und die enge Beziehung zur Wirtszelle Erythrozyt) wurde für diesen neu entdeckten vermeintlichen Blutparasiten der Name „*Eperythrozoon coccoides*“ vorgeschlagen.

DOYLE stellte im Jahr 1932 in den USA eine bis dahin nicht beschriebene Erkrankung bei 2 bis 8 Monate alten Schweinen fest, welche durch Iktereanämie, Dyspnoe, Schwäche und Fieber gekennzeichnet war. Er bezeichnete die Krankheit vorerst als „*Anaplasmosis-like Disease*“ bzw. „*ictero-anemia of swine*“. Im Jahr 1934 veröffentlichte KINSLEY einen Fallbericht über das Auftreten einer vergleichbaren Erkrankung. Er beobachtete kugelförmige, Anaplasmen ähnliche, Körperchen in den Erythrozyten erkrankter Schweine (KINSLEY, 1932).

Im Jahr 1950 stellten SPLITTER und WILLIAMSON schließlich den Zusammenhang zwischen dem Erreger der „*Anaplasmosis-like Disease*“ und den klinischen Anzeichen der experimentellen Eperythrozoonose bei Rind und Schaf her und bezeichneten den Erreger fortan als „*Eperythrozoon suis*“.

Der erste in Deutschland beschriebene Fall von Eperythrozoonose wurde 1968 von KORN und MUSSGAY (1968) im Rahmen der Aufklärung eines Schweinepestverdachts diagnostiziert.

2. Taxonomie von *M. suis*

Bis 2001 wurde der Erreger der infektiösen Anämie des Schweines, *Mycoplasma suis*, in die Ordnung der *Rickettsiales* eingeordnet. Diese Klassifizierung beruhte auf der Ähnlichkeit mit anderen Bakterien dieser Ordnung (geringe Bakteriengröße, Unkultivierbarkeit im Labor, gleiche Färbereigenschaften, mögliche Übertragung durch Arthropoden, hämotropher Charakter) (NEIMARK et al., 2001). Aufgrund dieser Eigenschaften wurde *M. suis* weiterhin der Familie der *Anaplasmataceae*,

Genus *Eperythrozoon* zugehörig erklärt.

Die hämotrophen Bakterien der Genera *Eperythrozoon* und *Haemobartonella* dringen allerdings nicht, wie die Anaplasmen, in die Erythrozyten ein, sondern heften sich auf der Erythrozytenoberfläche an und vermehren sich dort. Außerdem sind sie im Gegensatz zu Anaplasmen zellwandlos und nur von einer einfachen Membran umgeben (RIKIHISA et al., 1997; NEIMARK et al., 2001).

Diese und weitere für Mykoplasmen charakteristische Eigenschaften (epizelluläre Bindung an eine Wirtszelle, Bildung von Kälteagglutininen im Wirt, das Fehlen einer Zellwand sowie von Flagellen, Sensibilität gegenüber Tetracyclinen, Penicillin-Resistenz) führten zu der Vermutung, dass *Haemobartonella* spp. und *Eperythrozoon* spp. zu der Gattung der Mykoplasmen, Klasse *Mollicutes*, und nicht in die Ordnung der Rickettsien gehören (MESSICK, 2004). Daher wurden umfangreiche phylogenetische Analysen der 16S rRNA Gene durchgeführt (NEIMARK und KOCAN, 1997; RIKIHISA et al., 1997; NEIMARK et al., 2001). Hierbei wurde das 16S rRNA Gen von *Haemobartonella* spp. und *Eperythrozoon* spp. sequenziert und mit bereits erforschten Bakterien-DNA-Sequenzen verglichen. Diese Untersuchungen ergaben eine höhere Übereinstimmung der Gensequenzen von *Haemobartonella* spp. und *Eperythrozoon* spp. mit denen von *Mycoplasma* spp. als mit Sequenzen von *Anaplasma* spp.. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die beiden Genera *Haemobartonella* und *Eperythrozoon* der Klasse *Mollicutes*, Familie *Mycoplasmataceae*, Genus *Mycoplasma* zugeordnet (NEIMARK und KOCAN, 1997; RIKIHISA et al., 1997). Weitere Untersuchungen zeigten, dass die ehemaligen Vertreter der Genera *Haemobartonella* und *Eperythrozoon* ein eigenes Cluster innerhalb der Gruppe der Mykoplasmen repräsentieren, den der hämotrophen Mykoplasmen oder auch Hämoplasmen. Am nächsten verwandt sind sie mit den Mykoplasmen der *Pneumoniae*-Gruppe (NEIMARK et al., 2001; TASKER et al., 2003).

Die hämotrophen Mykoplasmen lassen sich in zwei Untergruppen unterscheiden: Die Haemofelis-Gruppe, die das ehemalige Genus *Haemobartonella* repräsentiert, und die Haemominutum-Gruppe, die die Vertreter des ehemaligen Genus *Eperythrozoon* beinhaltet (TASKER et al., 2003; PETERS et al., 2008). Beim Schwein konnten bisher zwei hämotrophe Mykoplasmenarten nachgewiesen werden, *Mycoplasma suis* und *Mycoplasma parvum* (SPLITTER, 1950b;

WATANABE et al., 2011; DO NASCIMENTO et al., 2014), welche sich phylogenetisch der Haemominutum-Gruppe zuordnen lassen (Abb. 1).

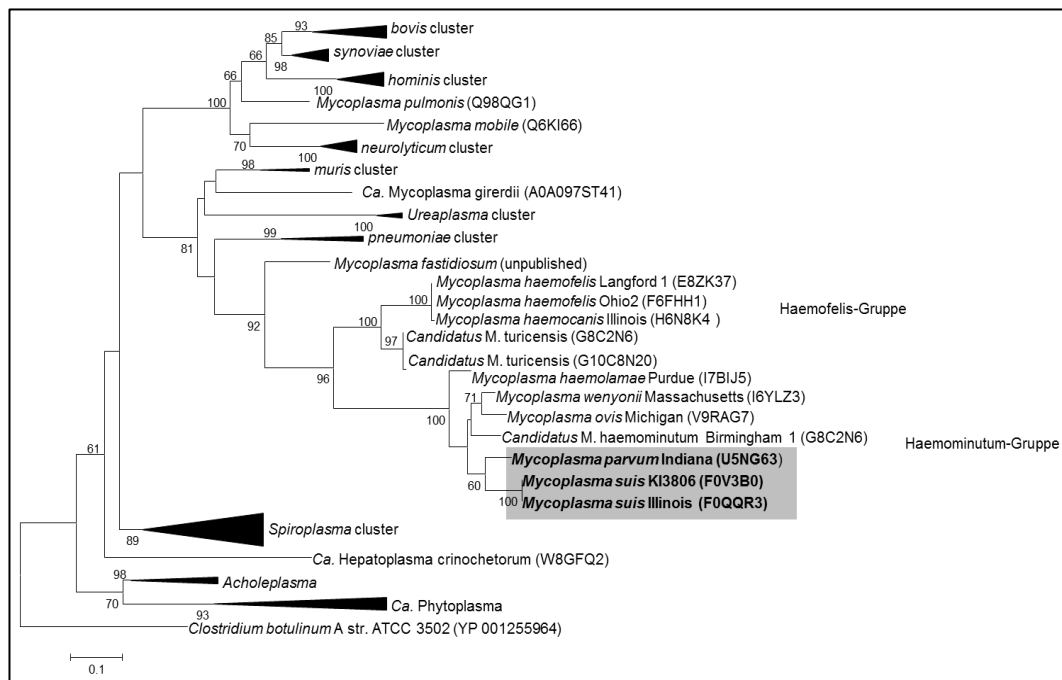


Abbildung 1: Phylogenetische Eingruppierung von *M. suis* und *M. parvum* basierend auf 16S rRNA-Gensequenzen (Kube und Hoelzle, unpublished).

Im Jahr 2008 wurde die taxonomische Zuordnung der Hämoplasmen zu den Mykoplasmen durch eine Analyse des RNase P RNA Gens (*rpmB*) bestätigt (PETERS et al., 2008).

Die einzigartigen biologischen Eigenschaften der Hämoplasmen, vor allem der reine Tropismus zu den Wirtserythrozyten, sowie die geringe Übereinstimmung ihrer 16S rRNA Sequenzen mit denen der nächstverwandten Mykoplasmen von nur 77–83 % (UILENBERG et al., 2004), führten allerdings zu Unstimmigkeiten bezüglich der Klassifizierung. Daher wurden die Hämoplasmen in der neuesten Ausgabe des „Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology“ der Ordnung *Mycoplasmatales*, Familie *incertae sedis* zugeordnet.

Dass eine klare Trennung der Hämoplasmen von den anderen Mykoplasmen besteht, bewiesen auch neueste phylogenetische Studien an den proteinkodierenden Genen der Glyceralaldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (*gapA*) und des Hitzeschockproteins 70 (*dnaK*) (HICKS et al., 2014).

3. Morphologie und Mikrobielle Eigenschaften von *M. suis*

M. suis ist ein kleines (ca. 0,3–3 µm im Durchmesser) Bakterium mit pleomorpher Gestalt. Es besitzt weder eine Zellwand, noch Flagellen und ist lediglich von einer einfachen Membran umgeben. Kleine Granula, Vakuolen und filamentöse Strukturen befinden sich im Zytoplasma, einen Zellkern besitzt es nicht (ZACHARY und BASGALL, 1985; MESSICK, 2004). Im Blut findet man *M. suis* vorwiegend auf der Oberfläche der Erythrozyten, bei hoher Bakterienzahl auch frei im Plasma (MESSICK, 2004; GROEBEL et al., 2009).

In elektronenmikroskopischen Untersuchungen (Abb. 2) sind drei verschiedene morphologische Formen des Bakteriums an der Erythrozytenoberfläche erkennbar. Zu Beginn einer Infektion tritt eine unreife, kleine, kokkoide Form auf, es folgt eine diskoide juvenile Form, während sich die ausgereiften Bakterien ringförmig mit einer tiefen zentralen Einziehung darstellen (ZACHARY und BASGALL, 1985; LIEBICH und HEINRITZI, 1992). Alle drei Formen nebeneinander findet man während einer akuten IAP (ZACHARY und BASGALL, 1985; LIEBICH und HEINRITZI, 1992; GROEBEL et al., 2009).

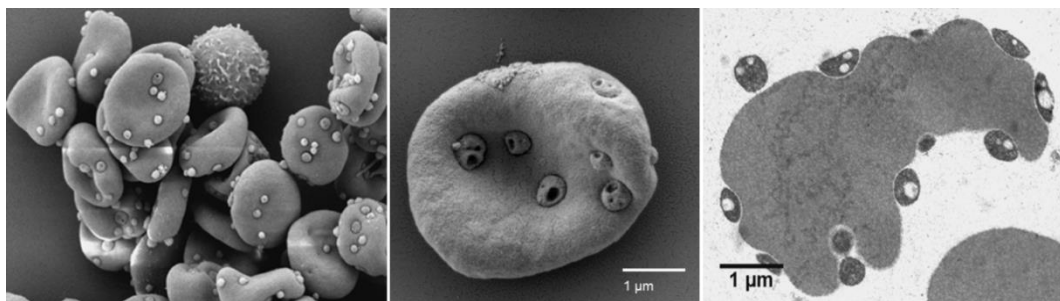


Abbildung 2: Rasterelektronenmikroskopische und transmissions-elektronenmikroskopische Darstellung von *M. suis* auf den Erythrozyten

Quelle: L.E. Hoelzle, Institut für Nutztierwissenschaften, Universität Hohenheim.

M. suis besitzt feine, fibrilläre Strukturen, welche einen 15-25 nm breiten Spalt zwischen Bakterium und Erythrozytenoberfläche überbrücken und somit die Anheftung des Bakteriums an seine Wirtszelle ermöglichen (ZACHARY und BASGALL, 1985; LIEBICH und HEINRITZI, 1992; MESSICK, 2004).

Im Bereich der Kontaktstelle finden sich deformative Veränderungen der

Erythrozytenmembran wie Eindellungen, Invaginationen, Verdichtungen und Kondensationen (HOELZLE et al., 2011). Bei hochpathogenen *M. suis*-Isolaten werden von tiefen Invaginationen der Erythrozytenmembran ausgehende, Endozytose-ähnliche Vorgänge beschrieben, welche zu einer intrazellulären Lage des Bakteriums in Vakuolen im Zytoplasma führen (GROEBEL et al., 2009). Auch frei im Zytoplasma liegende Mykoplasmen konnten mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie dargestellt werden (GROEBEL et al., 2009). Diese hochvirulenten Isolate scheinen sich, neben der eigentlichen Wirtszelle Erythrozyt, auch auf Zellen des Endothels ansiedeln und vermehren zu können (SOKOLI et al., 2013). Bis zu dieser Untersuchung war eine Vermehrung von *M. suis* nur im engen Kontakt mit Erythrozyten nachgewiesen worden (HOELZLE et al., 2011).

Bisher konnte das aus einer doppelsträngigen, zirkulären DNA bestehende Genom von zwei *M. suis*-Isolaten vollständig sequenziert werden. Das Isolat Illinois besitzt ein Genom mit der Größe von 742 kb (Kilobasenpaare), das invasive Isolat KI3806 von 709 kb (GUIMARAES et al., 2011b; OEHLERKING et al., 2011). Diese sehr kleine Genomgröße, sowie die Bakteriengröße von nur 0,3 µm, liegen nahe der theoretischen Minimalgröße, bis zu der eine eigenständige Replikation von Bakterien erfolgen kann (MESSICK, 2004; HOELZLE et al., 2011).

Die Untersuchungen des Genoms von *M. suis* ergaben weiterhin, dass ein hoher Prozentsatz hypothetischer Proteine ohne bisher bekannte biologische Funktion codiert wird sowie viele Stoffwechselwege und Transportsysteme fehlen oder nur unvollständig ausgebildet sind (GUIMARAES et al., 2011b; HOELZLE et al., 2011; OEHLERKING et al., 2011). In neuesten Analysen des *M. suis*-Proteoms konnten erstmals über 50 % der im Genom kodierten Proteine identifiziert und in funktionelle Kategorien eingeteilt werden (DIETZ et al., 2016).

Aufgrund der oben genannten Faktoren (Vermehrung nur im engen Kontakt zur Wirtszelle, kleines Genom, fehlende bzw. unvollständige Stoffwechselwege und Transportsysteme) ist davon auszugehen, dass das Bakterium stark an seine Wirtszelle Erythrozyt adaptiert ist und eine Abhängigkeit von ihr in Bezug auf essentielle Substanzen wie Amino- und Fettsäuren besteht (MESSICK, 2004; HOELZLE et al., 2011). Unterstützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass es bis dato nicht gelungen ist, ein dauerhaftes *in vitro*-Kultursystem für *M. suis* zu etablieren (HOELZLE, 2008). NONAKA und Mitarbeiter (1996) gelang die kurzzeitige Kultivierung in einer Erythrozytenkultur ohne Vermehrung

(„maintenance“). Versuche *M. suis* in einem speziellen Mykoplasmenmedium zu kultivieren, führten ebenfalls zu einem Überleben von Bakterienzellen („maintenance“). Dabei konnte zudem elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden, dass *M. suis* in der Flüssigkultur offensichtlich eine Art Nanotransformation durchläuft und kleine, metabolisch inaktive Mikrokolonien des Bakteriums gebildet werden (SCHREINER et al., 2012a).

4. Pathogenese und Immunologie der *M. suis*-Infektion

Das Wissen über die Pathogenese von *M. suis*-Infektionen ist begrenzt. Das liegt vor allem an der fehlenden Möglichkeit, *M. suis* im Labor zu vermehren und somit *in vitro* Zellkultur-Modellen Studien zur Pathogenese durchzuführen (HOELZLE et al., 2014). Bisherige Erkenntnisse beruhen vor allem auf Untersuchungen an splenektomierten, experimentell infizierten Schweinen. Neben diesen empirisch beschriebenen Ergebnissen aus den experimentellen Infektionen konnten in den letzten 10 Jahren durch die Etablierung neuer molekularer Technologien neue Einblicke in die Adhäsions- und Invasionsvorgänge, den Zelltropismus und die Immunpathologie von *M. suis* gewonnen werden (HOELZLE, 2008; HOELZLE et al., 2014).

4.1. Adhäsion und Invasion von *M. suis*

Die Adhäsion an Erythrozyten ist essentiell für den einzigartigen Lebensstil von hämotrophen Mykoplasmen (SCHREINER et al., 2012b). Aus elektronenmikroskopischen Studien ist bekannt, dass die Anheftung von *M. suis* an seine Wirtszelle durch feine fibrilläre Strukturen vermittelt wird, die einen etwa 15–25 nm breiten Spalt zwischen Bakterium und Erythrozyt überbrücken. Die Interaktion von *M. suis* mit den Erythrozyten führt dabei zu irreversiblen Schäden der Zellmembran, die sich als tiefe Eindellungen und Invaginationen darstellen (ZACHARY und BASGALL, 1985; MESSICK, 2004). Diese Veränderungen in der Membran führen zu direkter intravasaler Lyse von Erythrozyten sowie zur Phagozytose infizierter und veränderter Erythrozyten durch Makrophagen in Leber und Milz (HOELZLE et al., 2014).

Welche Mechanismen und Adhäsionsproteine entscheidend für den Adhäsionsvorgang von *M. suis* an seine Wirtszelle Erythrozyt sind, ist bisher aber

noch nicht umfassend geklärt. Typische Adhäsionskomplexe oder Adhäsionsorganellen, wie sie bei anderen Mykoplasmen beschrieben sind, scheinen bei *M. suis* zu fehlen bzw. sind noch nicht bekannt (MESSICK, 2004).

Bisher konnten drei in der Zellmembran von *M. suis* exprimierte Proteine eindeutig als an der Adhäsion beteiligt identifiziert werden.

MSG1 ist ein Glyceralaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) homologes Protein, welches sowohl im Zytoplasma wie auch in und auf der Zellmembran nachgewiesen werden kann (HOELZLE et al., 2007c). Das im Zytoplasma lokalisierte MSG1 hat eine Schlüsselfunktion im Glukosestoffwechsel inne und könnte somit für die Entwicklung der massiven Hypoglykämie während einer akuten IAP mitverantwortlich sein. Das membranassoziierte MSG1 verfügt nachweislich über die Fähigkeit, an Erythrozyten zu binden und ist somit vermutlich mitverantwortlich für die Adhäsion von *M. suis* an die Erythrozytenmembran (HOELZLE et al., 2007c).

Die α -Enolase konnte ebenfalls sowohl im Zytoplasma als auch in und auf der Membran von *M. suis* lokalisiert werden. Im Zytoplasma liegend zeigt sie glykolytische Aktivität und katalysiert die Umwandlung von 2-Phosphoglycerat in Phosphoenolpyruvat. Auf der Zellmembran kann sie mit Proteinen der Erythrozytenmembran interferieren und ist somit am Adhäsionsvorgang von *M. suis* beteiligt (SCHREINER et al., 2012b).

HspA1 ist ein DnaK-ähnliches Protein, welches Zytoplasma- und Membranassoziiert vorkommt. DnaK ist ein sogenanntes „heat shock protein“ und sowohl als Adhäsion wie auch, durch einen direkten aktivierenden Effekt auf das Immunsystem des Wirtes, als potentes Immunogen bekannt (HOELZLE et al., 2007b).

Bei Analysen des *M. suis*-Genoms wurden noch weitere potentielle Adhäsionsproteine von *M. suis* identifiziert: eine NADP-abhängige Glyceralaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPN), zwei MgpA-orthologe Proteine, sowie ein P 97-Analogon (GUIMARAES et al., 2011b; FELDER et al., 2012; HOELZLE et al., 2014).

Bei einigen hochpathogenen *M. suis*-Isolaten kommt es, ausgehend von tiefen Invaginationen der Erythrozytenmembran, zu Endozytose-ähnlichen Vorgängen.

Diese hochpathogenen Isolate können mittels Immunfluoreszenz intrazellulär in Vakuolen sowie frei im Zytoplasma liegend nachgewiesen werden (GROEBEL et al., 2009). Durch die intrazelluläre Lage ist die Virulenz dieser *M. suis*-Stämme deutlich gesteigert und die Erreichbarkeit des Erregers durch das körpereigene Immunsystem sowie mittels antibiotischer Behandlung erheblich erschwert (HOELZLE et al., 2014).

4.2. Immunologie der *M. suis*-Infektion

Ein bedeutender Pathomechanismus bei der Entstehung der Anämie während einer klinischen *M. suis*-Infektion ist die Bildung von autoreaktiven Antikörpern der Klassen IgG und IgM gegen Erythrozytenantigene (HOELZLE et al., 2014).

Warm-reaktive Antikörper der Klasse IgG treten vor allem während der akuten IAP zum Zeitpunkt der maximalen Bakteriämie auf (FELDER et al., 2010; HOELZLE et al., 2014). Zu diesem Zeitpunkt sind zu 95 % IgG-Antikörper und zu 5 % IgM-Antikörper nachweisbar (HOELZLE et al., 2006). Es werden verschiedene Mechanismen vermutet, die einzeln oder in Kombination zur Induktion von autoreaktiven IgG-Antikörper während der *M. suis*-Infektion führen können (FELDER et al., 2010). Eine Möglichkeit ist, dass es während der akuten IAP zu einer unspezifischen B-Zell-Proliferation kommt. Diese B-Zellen differenzieren zu Plasmazellen, welche autoreaktive IgG-Antikörper gegen porcine Erythrozyten bilden (HOELZLE et al., 2006; FELDER et al., 2010). Zusätzlich können aufgrund der Schädigung der Erythrozytenmembran durch die Adhäsion von *M. suis* normalerweise verborgene zytoskeletale Proteine zugänglich für zirkulierende Antikörper werden. Durch diesen Vorgang werden sie als Fremdantigene erkannt und es kann eine, mit der Bildung von autoreaktiven Antikörpern einhergehende, Immunantwort ausgelöst werden (FELDER et al., 2010).

Als weiterer möglicher Grund für die Bildung autoreaktiver IgG-Antikörper gegen das porcine α - und β -Aktin wird die sogenannte „molekulare Mimikry“ diskutiert. FELDER und Mitarbeiter (2010) konnten eine Kreuzreaktivität des *M. suis*-Oberflächenantigen MSG1 mit dem porcinen Aktin nachweisen, welche vermuten lässt, dass MSG1 an der Bildung von Autoantikörpern gegen Aktin beteiligt ist. α -Aktin kommt ausschließlich in Muskelzellen vor, β -Aktin ist im Zytoskelett verschiedenster Zellen zu finden. Bei Schädigung der Erythrozytenmembran durch *M. suis* wird es für zirkulierende Autoantikörper erreichbar (FELDER et al., 2010).

Durch IgG-Autoantikörper opsonierte Erythrozyten werden in der Milz und anderen retikuloendothelialen Organen gefiltert und aus der Blutbahn entfernt. In der Folge entsteht eine extravasale Hämolyse und indirekte Hyperbilirubinämie (HOELZLE et al., 2014). Die Bildung von wärmereaktiven IgG-Antikörpern in der frühen Phase der Infektion führt somit zu einer autoimmunen hämolytischen Anämie (AIHA).

In der chronischen Phase der Infektion können vor allem autoreaktive Kälteagglutinine der Klasse IgM nachgewiesen werden, die sich gegen Karbohydrat-Antigene auf der Erythrozytenoberfläche richten (HEINRITZI, 1990a; JÜNGLING et al., 1994; HOELZLE et al., 2006; HOELZLE, 2007). Möglicherweise erfolgt die vermehrte Bildung der IgM-Autoantikörper aufgrund einer Modifikation dieser Karbohydrate durch die Interaktion von *M. suis* mit seiner Wirtszelle Erythrozyt (HOELZLE et al., 2006). Sie verursachen eine Agglutination der Erythrozyten und sind somit verantwortlich für pathogene Effekte wie Zyanosen und Nekrosen an den Akren, wo die Körpertemperatur niedriger ist (HOFFMANN et al., 1981; HEINRITZI, 1990a; PLANK und HEINRITZI, 1990; HOELZLE et al., 2006). Zusätzlich kommt es vermutlich durch die Bindung von IgM-Antikörpern an die Erythrozyten zur Aktivierung des Komplementsystems und somit zu einer intravasalen Hämolyse der opsonierten Erythrozyten (HOELZLE et al., 2014). Somit führt auch die Bildung der IgM-Kälteagglutinine in der späten Phase einer *M. suis*-Infektion zu einer autoimmun hämolytischen Anämie (HOFFMANN et al., 1981).

4.3. Eingriff von *M. suis* in den Zellstoffwechsel

Bei Untersuchungen des Genoms von *M. suis* konnte festgestellt werden, dass diverse Stoffwechselwege fehlen oder nur unvollständig ausgebildet sind. Dies legt nahe, dass *M. suis* essentielle Nährstoffe aus der Umgebung bzw. von der Wirtszelle Erythrozyt bezieht (GUIMARAES et al., 2011b; HOELZLE et al., 2014). Die Analyse der sequenzierten *M. suis*-Genome zeigte, dass vermutlich wichtige Nährstoffe und Metaboliten wie z. B. Glukose, Inosin, Hypoxanthin, verschiedene Aminosäuren, NADH/NADPH und Ribose vom Wirt bezogen und nicht im eigenen Stoffwechsel produziert werden (GUIMARAES et al., 2011b).

Der Entzug von Nährstoffen führt bei infizierten Erythrozyten zu einer reduzierten Energieproduktion. Der daraus resultierende oxidative Stress bedingt eine

verkürzte Lebensspanne der Zelle und somit eine vorzeitige Entfernung aus der Blutbahn, es kommt zur Anämie (GUIMARAES et al., 2011b; HOELZLE et al., 2014). Glukose ist das wichtigste Substrat des Kohlenstoff-Stoffwechsels bei *M. suis* (OEHLERKING et al., 2011). Der Entzug der wirtseigenen Glukose für den Energiestoffwechsel von *M. suis* führt bei experimentell infizierten Tieren zu einer teilweise hochgradigen Hypoglykämie (PETERANDERL, 1988). Im *M. suis*-Genom und -Proteom konnten alle für die Aufnahme von Glukose nötigen Komponenten des Phosphotransferase-Systems identifiziert werden (DIETZ et al., 2016).

Die Nährstoffaufnahme-Kapazitäten von *M. suis* sind bislang noch nicht vollständig geklärt (GUIMARAES et al., 2011b; HOELZLE et al., 2014). Daher ist nach wie vor nicht klar, welche Nährstoffe dem Wirt bzw. den Wirtszellen durch eine hochgradige Vermehrung von *M. suis* entzogen werden. Nur ein kleiner Teil des Genoms kodiert für Transporter, so dass anzunehmen ist, dass diese entweder eine sehr breite Substratspezifität aufweisen oder bisher nicht identifizierte Sequenzen ebenfalls Transporterfunktionen erfüllen. In den durchgeführten Genom- und Proteomanalysen konnten bisher ABC-Transporter (ATP-Binding Cassette Transporter) für biogene Polyamine (Spermidin/Putrescin), Cobalamin, Hemin, Ferrichrom, Phosphat und Kobalt sowie ein eventuell multipotenter ECF-Transporter (Energy-Coupling Factor Transporter) identifiziert werden (GUIMARAES et al., 2011b; FELDER et al., 2012; DIETZ et al., 2016). Zusätzlich könnte auch die Invasion von Erythrozyten durch *M. suis* bei der Beschaffung von Nährstoffen eine Rolle spielen (GROEBEL et al., 2009; GUIMARAES et al., 2011b; HOELZLE et al., 2014).

4.4. Induktion der Eryptose

FELDER et al. (2011) konnten erstmals das Auftreten von Eryptose während einer experimentellen *M. suis*-Infektion im splenektomierten Schwein nachweisen. Der programmierte Zelltod von Erythrozyten (Eryptose) ist gekennzeichnet durch Zellschrumpfung, „Blebbing“ der Zellmembran, die Aktivierung von Proteasen und die Exposition von Phosphatidylserin auf der Erythrozytenmembran (LANG et al., 2012). Dies führt zu einem Erkennen der eryptotischen Zellen durch Makrophagen und somit zur Phagozytose (FELDER et al., 2011). Eryptose wird durch verschiedene Faktoren stimuliert, etwa durch oxidativen Stress, Energiemangel des Erythrozyten, Hyperthermie, Eisenmangel aber auch Infektionen mit Mykoplasmen

oder Malaria (LANG et al., 2012). Welches Signal bei einer *M. suis*-Infektion zu vermehrter Eryptose führt, ist noch nicht geklärt (FELDER et al., 2011). Dass die Eryptose bzw. die mit ihr verbundene Phagozytose der betroffenen Erythrozyten ein wichtiger Faktor der Pathogenese der Anämie bei einer *M. suis*-Infektion ist, steht aber außer Frage (FELDER et al., 2011). Ebenfalls besteht eine signifikante Korrelation der Menge an eryptotischen Zellen im Blut und der Stärke der Anämie bei *M. suis*-infizierten Tieren (FELDER et al., 2011).

4.5. Endothelschädigung durch *M. suis*

SOKOLI und Mitarbeiter (2013) konnten erstmals eine direkte Interaktion von *M. suis* mit den Endothelzellen der Blutgefäße infizierter Tiere feststellen. Diese ist wahrscheinlich für die ausgeprägten Endothelveränderungen wie die weitreichende Ablösung der Endothelzellen von der Basalmembran, das teilweise vollständige Fehlen von Endothelzellen und die Bildung von Fibrinthromben verantwortlich. Die Interaktion von *M. suis* mit dem zytoskeletalen Aktin führt zu Umlagerungen im Zytoskelett der Endothelzellen und zur Freilegung membrangebundener Phospholipide. Die Folge ist eine intravasale Gerinnungsaktivierung mit einer konsekutiven Verbrauchskoagulopathie (PLANK und HEINRITZI, 1990; SOKOLI et al., 2013). Im infizierten Tier äußert sich die Verbrauchskoagulopathie als Hämostasestörung mit erhöhter Blutungsneigung (hämorrhagische Diathese) und, durch die Ablagerung von Mikrothromben in den Gefäßen, als Zirkulationsstörung mit Funktionsstörung verschiedener Organe (PLANK und HEINRITZI, 1990).

5. Übertragungswege

Die Übertragung von hämotrophen Mykoplasmen erfolgt in erster Linie hämatogen. Dies geschieht vor allem iatrogen durch kontaminierte Kanülen und Gerätschaften bei zootechnischen Maßnahmen, sowie durch Rankkämpfe und kleinere Verletzungen (HENRY, 1979; HEINRITZI, 1992; HOELZLE et al., 2011).

Auch blutsaugende Arthropoden kommen als Vektoren in Betracht, unter experimentellen Bedingungen wurde eine Übertragung durch Läuse (*Haematopinus suis*), Räudemilben (*Sarcoptes scabiei suis*), Moskitos (*Aedes aegypti*) und Stechfliegen (*Stomoxys calcitrans*) nachgewiesen (HEINRITZI, 1992;

PRULLAGE et al., 1993).

Die Übertragung von *M. suis* durch die orale Aufnahme von Blut und Blutbestandteilen, zum Beispiel durch das Belecken von Wunden, Kannibalismus oder die Aufnahme von bluthaltigem Urin ist möglich (THACKER und MINION, 2012). Laut HEINRITZI (1992) entspricht die klinische IAP dabei in ihrer Intensität und ihrem Verlauf jener nach parenteraler Infektion. Die Inkubationszeit beträgt 8 bis 13 Tage und korreliert negativ ($r = -0,727$) mit der übertragenen Erregermenge (HEINRITZI, 1990a).

Bisher wurde angenommen, dass eine Übertragung durch die orale Aufnahme von Urin infizierter Tiere nur dann möglich ist, wenn dieser eine ausreichende Menge Blut oder Blutbestandteile enthält (HEINRITZI, 1992). Erstmals konnte nun *M. suis*-DNA auch in Urin ohne Blutbeimengungen nachgewiesen werden, so dass die Möglichkeit einer Übertragung durch zum Beispiel die orale Aufnahme von Urin denkbar erscheint (DIETZ et al., 2014). In dieser Untersuchung von DIETZ und Mitarbeiter (2014) konnten *M. suis*-DNA außerdem im Speichel, Nasen- und Vaginalsekret von experimentell infizierten Tieren nachgewiesen werden, so dass potentiell weitere, blutunabhängige Übertragungswege möglich erscheinen.

Über die Möglichkeit der Infektion von Ferkeln durch intrauterine Übertragung wurde erstmals 1954 von BERRIER und GOUGE (1954) berichtet. Laut CLAXTON und KUNESH (1975) wurde sie durch Smith an der Universität von Illinois experimentell nachgewiesen. Er konnte bei den via Kaiserschnitt entbundenen Ferkeln einer *M. suis*-infizierten Sau den Erreger im nach Giemsa gefärbten Blutaussstrich detektieren (CLAXTON und KUNESH, 1975). Mit den Untersuchungen von THIEL (1983), PRESTON und GREVE (1965) und HENDERSON und Mitarbeiter (1997) existieren gleich mehrere Fallberichte über *M. suis*-Infektionen in Betrieben, bei denen die Autoren eine intrauterine Übertragung des Erregers für wahrscheinlich halten. HEINRITZI (1992) konnte in seinen Untersuchungen allerdings keine intrauterine Übertragung nachweisen und hält diese aufgrund der Plazentationsart des Schweines (Semiplacenta diffusa incompleta) für unwahrscheinlich.

6. Zoonosepotential hämotropher Mykoplasmen

Obwohl hämotrophe Mykoplasmen im Allgemeinen als wirtsspezifisch gelten, gab es in den vergangenen Jahren wiederholt Berichte über die Infektion von Menschen mit tierspezifischen Hämoplasmen (PITCHER und NICHOLAS, 2005).

In China zeigten 28,51 % der in den Jahren 1991–2011 getesteten Menschen einen positiven Hämoplasmen-Befund (HUANG et al., 2012). Vor allem in ländlichen Gebieten und bei Menschen mit häufigem Tierkontakt war die Infektionsrate hoch. Allerdings erschwert die Diagnose mittels Blutausstrichen, die nach heutigem Kenntnisstand eine niedrige Sensitivität und Spezifität ausweisen, die Interpretation dieser Ergebnisse (ZHUANG et al., 2010). Auch kann keine Aussage über eine Spezieszuordnung der gefundenen Hämoplasmen gemacht werden.

Es gelangen immer wieder Nachweise von Hämoplasmeninfektionen beim Menschen mittels PCR, welche eine Übertragung vom Tier auf den Menschen belegen.

DOS SANTOS und Mitarbeiter (2008) veröffentlichten einen Fallbericht über einen mit HIV infizierten Patienten, bei dem *Mycoplasma haemofelis* nachgewiesen werden konnte.

In Shanghai konnten bei 49 % der getesteten Personen aus Berufsgruppen mit häufigem Tierkontakt 16s rRNA-Gensequenzen nachgewiesen werden, die zu 98 % homolog zu denen von *Mycoplasma suis* waren (YUAN et al., 2009).

In den USA wurden 4,66 % von 193 Personen mit hoher Arthropodenexposition und/oder häufigem Tierkontakt positiv auf Hämoplasmen-DNA getestet. Dabei handelte es sich in 9 von 11 Fällen um *Mycoplasma ovis*-DNA, in einem Fall um *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* und in einem Fall konnte die DNA nicht näher charakterisiert werden (MAGGI et al., 2013). Im Fallbericht zu einem der mit *M. ovis* infizierten Patienten, einem Tierarzt aus Texas, wird eine Co-Infektion mit *Bartonella henselae* beschrieben (SYKES et al., 2010). *M. ovis* ist ein weltweit verbreiteter Auslöser von hämolytischer Anämie, Ikterus und Fieber bei Schafen (SYKES et al., 2010), *Candidatus M. haematoparvum* wurde bisher ausschließlich beim Hund beschrieben (MAGGI et al., 2013).

STEER und Mitarbeiter (2011) beschrieben erstmals eine durch eine humane Hämoplasmen-Art hervorgerufene klinische Erkrankung beim Menschen. Bei einer

62-jährigen Engländerin mit hämolytischer Anämie, Fieber und Neutropenie wurde in der PCR-Analyse eine neue Hämoplasmen-Spezies nachgewiesen. Diese wies die größte Ähnlichkeit zu *Mycoplasma haemomuris* und *Candidatus Mycoplasma turicensis* auf und erhielt den Namen „*Candidatus Mycoplasma haemohominis*“.

7. Klinisches Erscheinungsbild einer *M. suis*-Infektion

Bei der infektiösen Anämie des Schweines (IAP) handelt es sich um eine zumeist subklinisch verlaufende Erkrankung, die bei Schweinen aller Altersklassen auftreten kann (HEINRITZI, 1989; THACKER und MINION, 2012). Man unterscheidet akute und chronische Verlaufsformen (HENRY, 1979; MESSICK, 2004). Der Krankheitsverlauf und die Inkubationszeit hängen dabei von verschiedenen Faktoren ab. Entscheidend sind sowohl die Virulenz des Erregerstammes und die Infektionsdosis, als auch die Empfänglichkeit des Einzeltieres (SPLITTER, 1951; HOELZLE, 2008; STADLER et al., 2014). Akute Krankheitsausbrüche treten daher meist bei Einzeltieren und nach besonderen Belastungen auf, etwa nach zootechnischen Maßnahmen, Umstallung, Absetzen oder auch bei bestehenden chronischen Infektionen anderer Genese (HEINRITZI, 1989; HOELZLE, 2008). Das klinische Erscheinungsbild unterscheidet sich dabei je nach Altersgruppe erheblich (BRÖMEL und ZETTL, 1985).

7.1. Klinisches Erscheinungsbild beim Saugferkel

Intrauterin mit *M. suis*-infizierte Ferkel kommen häufig lebensschwach auf die Welt (CLAXTON und KUNESH, 1975; HENDERSON et al., 1997). Innerhalb der einzelnen Würfe variieren die Geburtsgewichte stark, sehr leichte Ferkel haben eine geringe Überlebenschance (BRÖMEL und ZETTL, 1985; HENDERSON et al., 1997). Durch Saug- und Fressunlust kommt es zum Kümern einzelner Tiere und somit zum Auseinanderwachsen der Würfe (BRÖMEL und ZETTL, 1985). Typischerweise zeigt sich eine therapieresistente Anämie mit Blässe und Ikterus (PRESTON und GREVE, 1965; BRÖMEL und ZETTL, 1985; HENDERSON et al., 1997). Bei einzelnen Tieren kann zusätzlich eine Tachypnoe und Tachykardie auftreten (HENDERSON et al., 1997). Auch vermehrtes Nabelbluten bei Neugeborenen ist in der Literatur beschrieben (CLAXTON und KUNESH, 1975). *M. suis*-infizierte Ferkel sind anfälliger für Sekundärinfektionen, dies führt zu höheren Verlusten in der Sägezeit (BRÖMEL und ZETTL, 1985; HENDERSON

et al., 1997). Die Morbidität für Saugferkel wird mit 15 % angegeben (PRESTON und GREVE, 1965).

7.2. Klinisches Erscheinungsbild beim Absetzferkel, Läufer und Mastschwein

Bei Absetzferkeln und Mastschweinen treten im akuten Anfall eine hochgradige Iktereoanämie und Fieber bis 42 °C auf (HEINRITZI, 1984a; BRÖMEL und ZETTL, 1985). Die Tiere zeigen Apathie, Anorexie und Dyspnoe (HEINRITZI, 1989). Die Haut betroffener Tiere ist blass bis ikterisch und es sind Blutungen unterschiedlicher Größe sowie zyanotische Verfärbungen an Ohren, Schwanz und distalen Gliedmaßen zu beobachten (HEINRITZI, 1984a; BRÖMEL und ZETTL, 1985). Der Blutglukosespiegel sinkt auf Werte unter 10 mg/dl ab, was zu lebensbedrohlichen Zuständen führt (PETERANDERL, 1988).

Chronisch infizierte Tiere kümmern, sie zeigen mangelnde Gewichtszunahmen, Blässe der Haut und struppiges Haarkleid (HEINRITZI, 1990b). Durch die Mikroagglutination des Blutes in den kleinen Blutgefäßen der Akren kommt es zu Ohrrend- bzw. Ohrmuschelzyanosen bis hin zu Ohrspitzennekrosen (HEINRITZI, 1984a). Es können allergische Hautreaktionen wie das Krankheitsbild des *Morbus maculosus* mit zahlreichen Petechien und Ekchymosen oder Urtikaria auftreten (HEINRITZI, 1984a; BRÖMEL und ZETTL, 1985).

Zusätzlich sind betroffene Tiere infolge der durch *M. suis* verursachten Immunsuppression anfälliger für sekundäre gastrointestinale und respiratorische Erkrankungen sowie für einen Parasitenbefall (HEINRITZI, 1989; GWALTNEY und OBERST, 1994; MESSICK, 2004).

BRÖMEL und ZETTL (1985) geben die Morbidität für diese Altersklasse mit weniger als 5 % an, die Mortalität mit 80–100 %. SPLITTER (1951) beobachtet eine Morbidität von 1–10 % bei hoher Mortalität der Tiere mit klinischen Symptomen. In betroffenen Herden wird zudem von einer großen Anzahl an subklinischen Verläufen berichtet (SPLITTER, 1951). Diesen subklinisch erkrankten Tieren kommt als lebenslange Überträger von *M. suis* eine besondere Bedeutung zu (HOELZLE, 2007).

7.3. Klinisches Erscheinungsbild bei der Sau

Sauen erkranken akut zumeist 3–4 Tage nach dem Umstallen in den Abferkelstall

oder nach dem Absetzen. Sie zeigen Anorexie, Fieber, Dysgalaktie und oftmals Mamma- und Vulvaödeme (HEINRITZI, 1984a; BRÖMEL und ZETTL, 1985; MESSICK, 2004). STRAIT und Mitarbeiter (2012) beschrieben den akuten Ausbruch einer *M. suis*-Infektion in einer naiven Sauenherde, bei dem Dysgalaktie 12–24 Stunden p.p. das einzig sichtbare klinische Symptom darstellt. Chronische Infektionen führen zum sogenannten „thin sow syndrom“ mit Kümmeren, Blässe und Gewichtsverlust (BRÖMEL und ZETTL, 1985; HEINRITZI, 1990a). In Folge kann es zu Reproduktionsstörungen wie erhöhter Umrauschquote, Embryontod, Abort und der Geburt lebensschwacher Ferkel kommen (BRÖMEL und ZETTL, 1985; GWALTNEY und OBERST, 1994; MESSICK, 2004).

7.4. Klinisches Erscheinungsbild beim experimentell infizierten Schwein

Unter experimentellen Bedingungen ist es in der Regel nicht möglich, durch die Übertragung von infektiösem Blut auf ein gesundes Schwein eine akute Erkrankung durch *M. suis* hervorzurufen (HEINRITZI, 1989). Daher werden als Versuchstiere für experimentelle Studien über den klassischen Verlauf einer akuten IAP splenektomierte Schweine genutzt. Die Entfernung der Milz reduziert dabei die natürliche Abwehr des Organismus, wodurch sich eine hochgradige Infektion entwickeln kann (SPLITTER, 1950a, 1951; HEINRITZI, 1989).

Im akuten Anfall können dabei zwei Phasen unterschieden werden:

1. Eine frühe Phase mit Fieber, Inappetenz und Apathie. Hämatologisch findet sich eine hohe Erregermenge im Blut, eine mäßige Anämie, geringgradige Bilirubinämie sowie eine lebensbedrohliche Hypoglykämie (SPLITTER, 1950a; ZACHARY und SMITH, 1985).
2. In der späten Phase zeigt sich eine hochgradige Anämie mit Abfall der Körpertemperatur unter den Normalwert, Dyspnoe, Apathie und blassen oder ikterisch verfärbten Schleimhäuten. Die Erregermenge im Blut fällt ab, es kommt zu einer Leukozytose mit vorübergehender Thrombozytopenie und deutlicher Bilirubinämie. Bedingt durch die Kälteagglutination der Erythrozyten kommt es zu Durchblutungsstörungen und lokaler Hypoxie an den Akren, die sich in leichter Marmorierung bis hin zu hochgradigen zyanotischen Verfärbungen der Ohrmuscheln, des Schwanzes sowie der distalen Gliedmaßen äußert (SPLITTER, 1950a; ZACHARY und SMITH, 1985;

HEINRITZI, 1990a).

8. Pathologisch-anatomisches und histopathologisches Bild

Bei einer Infektion mit *M. suis* sind die auffälligsten pathologischen Veränderungen die ausgeprägte Anämie und der hochgradige Ikterus des Tierkörpers und der Organe (DOYLE, 1932; HOFFMANN und SAALFELD, 1977). Es zeigt sich eine Gelbverfärbung des Körperfetts und der Subkutis, sowie der inneren Organe, vor allem der Gefäßintima, der Leber und der Nierenpapillen (SPLITTER, 1951; QUIN, 1960; THIEL, 1983). Die Leber kann zusätzlich herdförmige bis generalisierte Aufhellungen und Anzeichen einer Degeneration aufweisen (SPLITTER, 1951). In der Gallenblase findet sich zähflüssige Galle (SPLITTER, 1951). GLONEGGER-REICHERT (2015) beschreibt ein hochgradiges Gallenblasenbettödem sowie eine hochgradig vergrößerte Leber mit hellrot-gefleckten Farbaufhellungen.

Die Milz ist bis auf das 3–4fache ihres normalen Volumens vergrößert und von weicher Konsistenz (SPLITTER, 1951; QUIN, 1960; CLAXTON und KUNESH, 1975). Die Lymphknoten sind generalisiert ödematös und durch Blutresorption marmoriert (QUIN, 1960; KORN und MUSSGAY, 1968).

Oftmals findet sich ein blasses, schwammiges Herz und ein Hydroperikard (CLAXTON und KUNESH, 1975), sowie ein Lungenödem (QUIN, 1960).

Es treten subseröse und submuköse Einblutungen im Gastrointestinaltrakt sowie in der Harnblase, im Nierenbecken, in der Gallenblase, am Kehldeckel, unter dem Endokard und unter der Lungenserosa auf (KORN und MUSSGAY, 1968; PLANK und HEINRITZI, 1990). Das Blut ist hell und von wässriger Konsistenz, die Gerinnungsfähigkeit ist herabgesetzt (DOYLE, 1932; KORN und MUSSGAY, 1968; CLAXTON und KUNESH, 1975).

DOYLE (1932) beschreibt Ansammlungen von ikterischer Flüssigkeit in Bauchhöhle (Aszites), Thorax (Hydrothorax) und Perikard (Hydroperikard). Auch Magen- und Darminhalt zeigen eine gelbliche Verfärbung durch Gallepigmente (DOYLE, 1932; SPLITTER, 1951; QUIN, 1960).

In der histopathologischen Untersuchung beschreiben CLAXTON und KUNESH

(1975) und THIEL (1983) zentrolobuläre Nekrosen der Leberläppchen, während sich in Untersuchungen von GLONEGGER-REICHERT (2015) peripherlobuläre Leberparenchymnekrosen finden. Zusätzlich zeigt sich hier eine interstitielle Hepatitis mit lymphozytärer Infiltration unter Beteiligung von eosinophilen Granulozyten. Die Makrophagen von Leber (Kupffersche Zellen), Milz und Lymphknoten zeigen zytoplasmatische Hämosiderineinlagerung und gesteigerte Erythrophagozytose (CLAXTON und KUNESH, 1975; HOFFMANN et al., 1981; THIEL, 1983). Das Knochenmark ist hyperplastisch und die Erythropoese aktiviert (CLAXTON und KUNESH, 1975; HOFFMANN et al., 1981).

9. Diagnostik

9.1. Klinische Diagnose

Beim Auftreten von plötzlichen Fieberanfällen bis 42 °C mit Anämie, Ikterus und Zyanosen an den Akren, sowie allergischen Hautreaktionen wie *Morbus maculosus* oder Urtikaria sollte differentialdiagnostisch an eine Infektion mit *M. suis* gedacht werden (HEINRITZI, 1984a). Eine ausreichend sichere Aussage kann nur im akuten Anfall mit oben genannten Symptomen getroffen werden, allerdings erschwert das gleichzeitige Auftreten von Sekundärinfektionen die klinische Diagnose einer *M.suis*-Infektion sehr (HEINRITZI, 1990b).

9.2. Hämatologische und klinisch-chemische Veränderungen

Bei einer akuten IAP fallen bereits morphologische Veränderungen des Blutes auf. Es erscheint dünnflüssig, wässrig und lackfarben. Ungerinnbar gemachtes Blut zeigt eine feingrieselige Mikroagglutination der Erythrozyten, welche sich im abkühlenden Blut verstärkt und bei Erwärmung auf 37 °C wieder verschwindet (HEINRITZI, 1984a; PETERANDERL, 1988). Die Ursache der Mikroagglutination ist das Auftreten von Kälteagglutininen, welche sich temperaturabhängig an die Erythrozytenmembran anheften und so zur Agglutination von Erythrozyten führen (HEINRITZI, 1990a). Das Blutserum bzw. -plasma ist deutlich ikterisch verfärbt (HEINRITZI, 1984a).

Im roten Blutbild zeigt sich eine normochrome, normozytäre Anämie, das heißt es kommt zu einem parallelen Abfall von Erythrozytenzahl, Hämatokrit und Hämoglobinkonzentration bei normalen MCHC- und MCV-Werten (HEINRITZI,

1984a; PETERANDERL, 1988; HEINRITZI, 1990b).

Im weißen Blutbild fällt meist 1–2 Tage vor oder nach dem Fieberanfall eine deutliche Leukozytose mit Anstieg der Anzahl von neutrophilen Granulozyten auf (HEINRITZI, 1984a; PLANK und HEINRITZI, 1990).

Betrachtet man die klinisch-chemische Untersuchung, sind vor allem die extrem niedrigen Glukosewerte von teilweise unter 10 mg/dl von Bedeutung. Diese sind auf den gesteigerten Verbrauch von Glukose durch den Metabolismus von *M. suis* zurückzuführen und korrelieren negativ mit der Erregermenge im Blut (PETERANDERL, 1988). Bedingt durch die ausgeprägte Hämolyse kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Bilirubinkonzentration im Blut, da die Leber nicht mehr in der Lage ist, das anfallende Bilirubin zu verstoffwechseln (HEINRITZI, 1984a). Der gleichzeitige Anstieg von Gesamtbilirubin, Aspartat-Aminotransferase (AST) und Glutamatdehydrogenase (GLDH) bei normaler Kreatinkinase (CK) deutet außerdem auf eine hypoxisch bedingte Schädigung des Lebergewebes hin (PLANK und HEINRITZI, 1990).

In der akuten Phase entwickelt sich eine metabolisch-respiratorische Blutazidose. Verantwortlich hierfür sind als metabolische Komponente der erhöhte Laktatspiegel im Blut durch den Abbau von Glukose durch *M. suis* und als respiratorische Komponente der verminderte pulmonale Gasaustausch (PETERANDERL, 1988; HEINRITZI et al., 1990). Die deutliche Absenkung des Blut-pH-Wertes zusammen mit der extremen Hypoglykämie kann zu lebensbedrohlichen Zuständen führen (PETERANDERL, 1988).

Bei *M. suis*-infizierten Tieren fällt eine erhöhte Blutungsneigung, z. B. nach Injektionen, auf. Diese Störung der Hämostase ist Folge einer disseminierten intravasalen Gerinnung mit nachfolgender Verbrauchskoagulopathie. Die Prothrombin- und Thromboplastinzeit sind erhöht, die Thrombozytenzahl erniedrigt. Im Blutaussstrich fallen vermehrt Thrombozytenaggregate auf (PLANK und HEINRITZI, 1990).

9.3. Mikroskopischer Erregernachweis

Ein direkter lichtmikroskopischer Erregernachweis von *M. suis* im Blut gelingt in nach Wright, Pappenheim, Romanowsky und Giemsa oder mittels Schnellfärbemethoden gefärbten Blutaussstrichen (KORN und MUSSGAY, 1968;

KREIER und GOTHE, 1976; POSPISCHIL und HOFFMANN, 1982; ZACHARY und BASGALL, 1985; HEINRITZI, 1990a). Ein fluoreszenzmikroskopischer Nachweis ist nach einer Färbung mit Acridinorange möglich (HEINRITZI, 1990a; RITZMANN et al., 2009; HOELZLE et al., 2011). Allerdings weist die mikroskopische Nachweismethode, v. a. bei chronisch infizierten Tieren, eine geringe Sensitivität und Spezifität auf. Eine sichere Diagnosestellung ist erst ab einer Erregeranzahl von $>10^5$ *M. suis*/ml Blut möglich. Diese wird nur in der Phase der akuten IAP erreicht (RITZMANN et al., 2009; HOELZLE et al., 2011).

Vor dem Anfertigen eines Ausstrichs sollten Blut und Objektträger auf 37 °C erwärmt werden, damit sich die durch Kälteagglutinine verursachten Erythrozytenagglomerate auflösen und eine gute Ausstrichqualität erreicht werden kann (HEINRITZI, 1990a).

Im nach Giemsa gefärbten Blutausstrich variiert die Farbe der Erreger je nach pH-Wert des Puffers und den Eigenschaften des Ausstriches zwischen blass-rot und rötlich-lila. Bei chronischen Infektionsverläufen ist eine Differenzierung von Erreger und Erythrozytenmembran nicht möglich. Eine weitere häufige Fehlerquelle bei der Interpretation nach Giemsa gefärbter Ausstriche ist außerdem die Verwechslung des Erregers mit Giemsa-Ausfällungen (KREIER und GOTHE, 1976; KREIER und RISTIC, 1981; HEINRITZI, 1990a; LIEBICH und HEINRITZI, 1992).

In der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von mit Acridinorange gefärbten Ausstrichen stellen sich die Erreger im akuten Anfall als hell- bis dunkelorange, im chronischen Verlauf als hellgelbe bis hellgrüne leuchtende Punkte vor dunklem Hintergrund dar. Die Erythrozyten färben sich grün an, Leukozytenkerne erscheinen orange (HEINRITZI, 1990b). Durch die Fluoreszenz können die Erreger bereits bei geringerem Befall gut erkannt werden. Allerdings werden mit Acridinorange alle Kerne und Kernreste angefärbt, so dass sich unreife Erythrozyten sowie Howell-Jolly-Körperchen ähnlich darstellen können. Dies kann zu Fehlinterpretationen und einer hohen Anzahl falsch positiver Befunde führen (HEINRITZI, 1990a, 1990b; LIEBICH und HEINRITZI, 1992; RITZMANN et al., 2009; HOELZLE et al., 2011).

9.4. ELISA

Der ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) zählt zu den serologischen

Nachweisverfahren zum Nachweis von Antikörpern. Er beruht auf der spezifischen Bindung zwischen einem Testantigen und den im Organismus gebildeten Antikörpern (BÜTTNER, 2007).

SCHULLER und Mitarbeiter (1990) gelang erstmals der Nachweis von Antikörpern nach einer *M. suis*-Infektion mittels eines ELISA. Auch HSU und Mitarbeiter (1992) entwickelten einen Ganzzell-ELISA zur Detektion von Antikörpern gegen *M. suis*.

Die Testantigene dieser ersten ELISA-Testverfahren wurden aus dem Blut von *M. suis* infizierten Schweinen gewonnen und enthielten daher auch andere Blutbestandteile, wie zum Beispiel Immunglobuline. Diese können mit *M. suis*-spezifischen sowie den sekundären konjugierten Anti-Schwein-Antikörpern im ELISA interferieren. Um interpretierbare Testergebnisse zu erhalten und die Spezifität des Testverfahrens erheblich zu erhöhen, wurde in einem weiteren ELISA eine Depletion von Immunglobulinen aus dem Testantigen durchgeführt (HOELZLE et al., 2006).

Eine weitere signifikante Steigerung von Sensitivität, Spezifität, Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit konnten HOELZLE und Mitarbeiter (2007a) durch die Entwicklung eines rekombinanten ELISAs erreichen. Hierbei wurden zwei Hauptimmunogene von *M. suis*, MSG1 und HspA1, rekombinant in *Escherichia coli*-Kulturen hergestellt und einzeln oder in Kombination als Testantigene eingesetzt. Es zeigte sich eine Sensitivität von 94 % bzw. 100 % und eine Spezifität von 100 % bzw. 94 %. Durch die Kombination der Antigene konnte eine Erhöhung der Sensitivität erreicht werden.

ZHANG und Mitarbeiter (2012) entwickelten, ebenfalls auf MSG1 basierend, einen Blocking-ELISA mit monoklonalen Antikörpern gegen das rekombinante MSG1-Protein, welcher sich ebenfalls durch eine hohe Spezifität von 100 % auszeichnet.

Der neueste, von GUIMARAES und Mitarbeiter (2014) entwickelte „multiplex-microbead-immunoassay“ (MIA) erlaubt nun eine gleichzeitige Detektion von Antikörpern gegen mehrere Antigene von *M. suis* (das Enzym GAPN, das Hitzeschockprotein GrpE und das hypothetische Protein pf184 aus der Gen-Familie PGF) in einem Testdurchlauf und somit einen sensitiven, spezifischen und zuverlässigen Nachweis von Antikörpern gegen *M. suis*.

9.5. Polymerase chain reaction (PCR) und quantitative real-time PCR

Die PCR ist eine molekulare Technik zur *in vitro* Vervielfältigung (Amplifikation) bestimmter Fragmente der bakteriellen DNA. Die Analyse der amplifizierten PCR-Produkte erfolgt anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese. Die PCR ist eine sehr effiziente, spezifische Methode und geeignet, um auch kleine Erregermengen zuverlässig zu detektieren (MESSICK, 2004; CHANDLER und COLITZ, 2006). Für den Nachweis von *M. suis*-DNA wurden mehrere Protokolle beschrieben, welche auf der Amplifikation unterschiedlicher Gensequenzen beruhen, z. B. auf Sequenzen des KSU-2-Klons (GWALTNEY et al., 1993b; GWALTNEY und OBERST, 1994), des 16S rRNA-Gens (RIKIHISA et al., 1997; MESSICK et al., 1999; MESSICK et al., 2000) oder einem 1.8 kb großen *EcoRI* DNA-Fragment des *M. suis*-Genoms (HOELZLE et al., 2003).

Mit der real-time PCR ist die gleichzeitige Amplifikation und Quantifizierung von Erreger-DNA auf der Basis von Fluoreszenz-Messungen möglich (BÜTTNER, 2007). Durch das geschlossene System bei real-time PCR-Methoden ist die Gefahr von Kreuzkontaminationen deutlich geringer als bei einer konventionellen PCR (LYON und WITTWER, 2009). Durch das hohe Maß an Automatisierung, Reproduzierbarkeit und Standardisierung, sowie die schnelle Durchführbarkeit der Untersuchung ist die real-time PCR ein geeignetes Verfahren für die Routinediagnostik von viralen und bakteriellen Erkrankungen im Labor (BÜTTNER, 2007; HOELZLE et al., 2007d).

Die erste quantitative LightCycler® PCR zum Nachweis von *M. suis* wurde von HOELZLE und Mitarbeiter (2007d) entwickelt. Sie basiert auf Sequenzen des MSG1-Gens und weist eine Sensitivität von 100 % sowie eine Spezifität von 96,7 % auf.

GUIMARAES und Mitarbeiter (2011a) und WATANABE und Mitarbeiter (2012) setzten eine für *M. suis* ebenfalls hoch sensitive und spezifische quantitative PCR unter Nutzung des 16S rRNA-Gens ein.

Die quantitative real-time PCR gilt heute als die Methode der Wahl für die Diagnose einer *M. suis*-Infektion und eignet sich zur sicheren Identifizierung akut erkrankter wie auch subklinisch infizierter Tiere (RITZMANN et al., 2009). Als Untersuchungsmaterial sind neben EDTA-Blutproben auch Organproben verstorbener Tiere als Untersuchungsmaterial geeignet (HOELZLE et al., 2007d).

9.6. Immunhistochemischer Nachweis und In-Situ-Hybridisierung

Das Prinzip der Immunhistochemie (IHC) beruht auf der Darstellung eines Antigens (z. B. eines Proteins) in Zellen oder Geweben mit Hilfe eines markierten, spezifischen Antikörpers als Antigen-Antikörper-Reaktion. Dies erlaubt im Gegensatz zu anderen Diagnostikmethoden eine Beurteilung von Antigen und Läsion im morphologischen Kontext und somit eine weitergehende Interpretation und ein tieferes Verständnis der Pathogenese von Erkrankungen (RAMOS-VARA und MILLER, 2014). Über den immunhistochemischen Nachweis von *M. suis* gibt es in der Literatur bisher nur wenige Berichte.

SOKOLI und Mitarbeiter (2013) gelang die Darstellung von *M. suis* mit Hilfe von polyklonalen Kaninchenimmunseren gegen zwei verschiedene Oberflächenantigene des Bakteriums (α -Enolase und HspA1). Mit dem polyklonalen anti- α -Enolase-Kaninchenimmunserum konnten in formalinfixierten, Paraffin-eingebetteten Organen von experimentell mit *M. suis* infizierten Tieren (Duodenum, Jejunum, Ileum, Colon, Herz, Lunge, Leber, Mesenteriallymphknoten und Milz) zahlreiche Bakterien auf den Erythrozyten sowie im abgelösten Endothel des vaskulären Systems nachgewiesen werden.

Eine immunhistochemische Untersuchung mittels eines polyklonalen anti-HspA1-Kaninchenimmunserums von in vitro mit *M. suis* infizierten PAECs (porcine aortic endothelial cells) erlaubte eine Darstellung von *M. suis*-Aggregaten auf der Zelloberfläche, eine Vermehrung des Bakteriums auf Endothelzellen konnte in diesem Versuchsansatz aber nicht nachgewiesen werden (SOKOLI et al., 2013).

Zudem wurde der Nachweis von *M. suis* mittels In-situ-Hybridisierung (ISH) beschrieben. Diese Methode beruht auf einer komplementären Bindung von markierten DNA- oder RNA-Sonden an Nukleinsäuren in intakten Zellen oder Geweben und erlaubt somit, wie die IHC auch, eine Lokalisation und Darstellung der gesuchten Nukleinsäure im morphologischen Kontext (MOENCH, 1987; LOOI und CHEAH, 1992).

GWALTNEY und Mitarbeiter (1993a) nutzten erstmals eine auf *M. suis*-spezifischer DNA (KSU-2) basierende ISH zur Darstellung von Bakterien im Erythrozytenpellet.

Eine ISH zum Nachweis von *M. suis*-16S rDNA in formalinfixierten, Paraffin-eingebetteten Organen (Leber, Lymphknoten, Tonsille, Herz, Lunge, Nieren,

Dünn- und Dickdarm) experimentell infizierter und splenektomierter Schweine führten HA und Mitarbeiter (2005) durch. Sie konnten deutliche Erythrozyten-assoziierte Signale in Blutgefäßen, Lebersinusoiden und Nierenglomerula darstellen, diese blieben aber fokal und ausschließlich auf rote Blutzellen beschränkt.

Untersuchungen zu anderen hämotrophen Mykoplasmen führten zu ähnlichen Ergebnissen. So konnten PETERS und Mitarbeiter (2011) spezifische Signale von *M. haemofelis* 16S rDNA in Organen infizierter Katzen ausschließlich im Zusammenhang mit roten Blutzellen und in Assoziation mit Blutgefäßen, Milzpulpa, Lebersinusoiden, Nierenglomerula und Knochenmark darstellen. BERENT und Mitarbeiter (2000) führten eine ISH ebenfalls mit einer 16S-Sonde an Leber- und Nierenproben von mit *M. haemofelis* infizierten Katzen durch. Positive Signale wurden wiederum fokal und begrenzt auf rote Blutzellen in großen Blutgefäßen, Lebersinusoiden und Glomerula nachgewiesen.

9.7. Kultivierung von *M. suis*

Bis dato ist es nicht gelungen ist, ein dauerhaftes *in vitro*-Kultursystem für *M. suis* zu etablieren (HOELZLE, 2008). NONAKA und Mitarbeiter (1996) gelang zwar die kurzzeitige Erhaltung der Bindung des Erregers an die Erythrozyten sowie die Messung der glykolytischen Aktivität von *M. suis* in einer Erythrozytenkultur („maintenance“). Eine kontinuierliche Kultivierung wurde aber nicht erreicht.

SCHREINER und Mitarbeiter (2012a) untersuchten die Möglichkeit der Kultivierung von *M. suis* in einem klassischen Mykoplasmenmedium sowie unter Zusatz von Nährstoffen wie Glukose und verschiedenen eisenhaltigen Proteinen. Es konnte ebenfalls eine Persistenz des Erregers („maintenance“) über bis zu 12 Wochen erreicht werden, eine Vermehrung gelang nicht. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der kultivierten Bakterien zeigten die Bildung von unregelmäßig geformten, gedrunenen Nanoformen auf, die in Mikrokolonien angeordnet waren. Es ist daher davon auszugehen, dass die verwendeten Standardmedien keine optimalen Wachstumsbedingungen für *M. suis* bieten und durch die Kultivierung eine Nanotransformation von *M. suis* induziert wird (SCHREINER et al., 2012a).

10. Therapie und Prophylaxe

Mittel der Wahl zur Therapie einer akuten IAP ist Oxytetracyclin in einer Dosierung von 20–30 mg/kg Körpergewicht parenteral. Dies führt bereits nach einmaliger Applikation zu einer deutlichen Besserung der klinischen Symptome sowie zu einer raschen Normalisierung des roten Blutbildes. Eine Eliminierung des Erregers wird allerdings nicht erreicht, die Tiere bleiben ein Leben lang Träger und potentielle Überträger von *M. suis* (HEINRITZI, 1984a, 1990a; HOELZLE, 2007). In betroffenen Betrieben sind daher Hygiene- und Desinfektionsmaßnahmen sowie eine konsequente Bekämpfung von Ektoparasiten besonders wichtig, um eine weitere Verschleppung zu verhindern. Bei zootechnischen Maßnahmen sollten für jeden Wurf neue, sterile Instrumente verwendet werden und der Gebrauch von Einmalkanülen ist anzuraten (HOFFMANN und SAALFELD, 1977; HEINRITZI, 1984a; HOELZLE, 2007).

Ein Impfstoff gegen *M. suis* steht zurzeit noch nicht zur Verfügung. Dies liegt vor allem an der Unkultivierbarkeit des Bakteriums im Labor. Versuche mit einem im *E.coli*-System rekombinant hergestellten und auf dem Adhäsionsprotein MSG1 basierenden *M. suis*-Impfstoff induzierten zwar eine starke Immunantwort im Tier, erzeugten aber keine protektive Wirkung (HOELZLE et al., 2009).

In Betrieben mit niedriger Prävalenz ist eine Identifizierung und Eliminierung von Trägartieren in Erwägung zu ziehen (HOELZLE, 2007).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Tierversuch

Der im Folgenden beschriebene Versuch wurde im Zeitraum Oktober 2014 bis März 2015 an der Klinik für Schweine der LMU München in Oberschleißheim durchgeführt. Der Tierversuch sowie ein Antrag auf Erweiterung wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt und werden dort unter dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-87-12 geführt.

1.1. Versuchstiere

Der Versuch wurde an 14 weiblichen Masthybriden durchgeführt. Diese stammten aus der Lehr- und Versuchsstation Thalhausen der TU Weihenstephan. Die Tiere wurden als Absetzferkel im Alter von 28 Tagen und mit einem durchschnittlichen Gewicht von 9 kg in die Klinik für Schweine der LMU München eingestallt.

Die Tiere wurden zunächst in Gruppenbuchten á 7 Tieren gehalten und zum Zeitpunkt der Splenektomie in Einzelbuchten verbracht. Die Haltung erfolgte über den gesamten Versuchszeitraum auf planbefestigtem Boden mit Stroheinstreu, in den Buchten befanden sich Rotlichtlampen sowie Beschäftigungsmaterial in Form von Ketten oder Bälle. Nippeltränken versorgten die Tiere ad libitum mit Wasser. Die Fütterung erfolgte zweimal täglich mit einem pelettierten Ferkelfutter (Fa. Zimmererwerke, Landshut).

Die Stalltemperatur betrug zum Zeitpunkt des Versuchs 20–22 °C und wurde täglich kontrolliert, die relative Luftfeuchtigkeit betrug 60–80 %, in den Buchten wurde eine Beleuchtungsintensität von 160–400 Lux gemessen.

1.2. Versuchsüberblick

Der Versuch wurde in zwei Versuchsgruppen zu jeweils sieben Tieren durchgeführt. Vor Beginn des Versuchs wurde von allen Tieren eine EDTA-Blutprobe entnommen und mittels quantitativer LightCycler MSG1-PCR auf *M. suis* untersucht (HOELZLE et al., 2007d). In den Versuch wurden nur *M. suis*-negative Tiere eingeschlossen. Alle Versuchstiere wurden eine Woche nach Einstellung in die Klinik für Schweine splenektomiert und wiederum eine Woche nach Splenektomie entweder subkutan (im Folgenden Gruppe I) oder oral (im Folgenden Gruppe II) mit dem *M. suis*-Feldstamm K323/13 (GLONEGGER-

REICHERT, 2015) infiziert. Der anschließende Versuchszeitraum betrug 90 Tage. Die Entnahme von Blutproben erfolgte in den ersten 10 Tagen *post infectionem* an jedem 2. Tag und folgend bis zum Versuchsende einmal wöchentlich. Am Ende des Versuchszeitraumes bzw. bei Erreichen der Abbruchkriterien (Anhang XI.1) wurden die Tiere euthanasiert und anschließend pathologisch und histopathologisch untersucht.

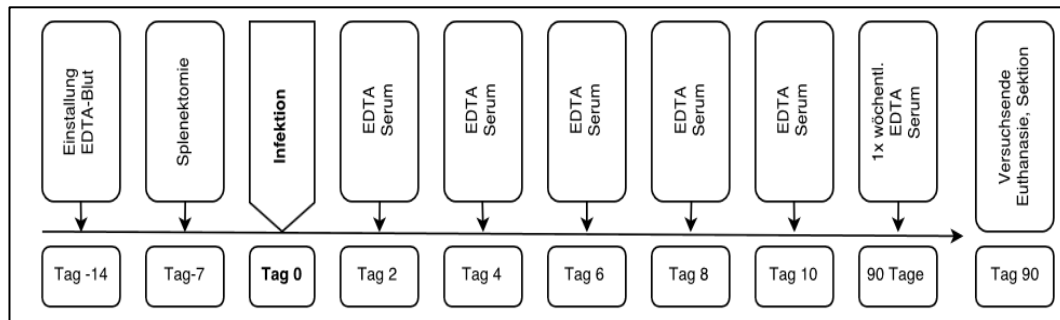


Abbildung 3: Zeitlicher Versuchsablauf

1.3. Splenektomie

Die Tiere beider Versuchsgruppen wurden jeweils eine Woche nach Einstellung nach der Methode von HEINRITZI (1984b) splenektomiert. Die Narkoseeinleitung erfolgte mittels intramuskulärer Injektion von Azaperon (Stresnil® 40 mg/ml, 2 mg/kg KGW, JANSSEN-CILAG GmbH, Neuss, Deutschland) und Ketamin (Ursotamin® 100 mg/ml, 10-25 mg/kg KGW, Serumwerk Bernburg, Bernburg, Deutschland), nach Intubation erfolgte die Narkoseerhaltung mittels Inhalationsnarkose mit Isofluran (Isofluran CP® 1 ml/ml, CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Deutschland). Die Tiere wurden perioperativ mit Metamizol (Novaminsulfon® 0,3-1 ml/10kg KGW, bela-pharm GmbH & Co. KG, Vechta, Deutschland) und Meloxicam (Metacam® 2 ml/kg KGW, Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Deutschland) analgetisch abgedeckt.

Die Splenektomie erfolgte von der linken Bauchwand ausgehend. Mittels eines ca. 10 cm langen Schnittes parallel und mit zweifingerbreitem Abstand zum Rippenbogen wurden Haut, Muskelschichten, Faszien und das Peritoneum durchtrennt. Nach Vorverlagerung der Milz aus der Operationswunde erfolgte die Ligatur von A. und V. *gastroepiploica* mit anschließender Durchtrennung. Mithilfe

eines Schlingenführers nach Heinritzi wurde ein Faden über den dorsalen Milzpol geführt und die *Aa.* und *Vv. lienalis* und *gastricae breves* ligiert.

Das anschließende Absetzen der Milz erfolgte unter Fingerschutz der Ligatur. Nach Kontrolle der Gefäßstümpfe auf Blutungen wurde das Peritoneum mittels Matratzennaht und rückläufiger Kürschnernaht verschlossen. Der Verschluss der Muskelschichten erfolgte mittels Sultanscher Diagonalhefte, der der Haut mit einer Donati-Naht. Die Fäden der Hautnaht wurden 10 Tage post OP gezogen.

Bis zum dritten Tagen nach der Splenektomie wurden die Tiere mit Penicillin (Vetriproc® 30 % 0,5-1 ml/15 kg KGW, CEVA Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf, Deutschland) antibiotisch und mit Meloxicam (Metacam® 2 ml/kg KGW, Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Deutschland) analgetisch versorgt, um einer Wundinfektion und postoperativen Schmerzen vorzubeugen.

1.4. Infektion

Eine Woche nach der Splenektomie wurde Gruppe I durch die subkutane Applikation von 1,5 ml *M. suis*-haltigem Blut ($2,0 \times 10^7$ *M. suis*/ml Blut) mit dem *M. suis*-Feldstamm K323/13 infiziert. Den Tieren der Gruppe II wurde jeweils 1,5 ml Blut mit der gleichen Erregermenge ($2,0 \times 10^7$ *M. suis*/ml Blut) oral verabreicht.

Zur Vorbeugung von Sekundärinfektionen erfolgte eine Applikation von Penicillin (Vetriproc 30 %®, 1 ml/10 kg KGW, CEVA Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf) intramuskulär über drei Tage.

Der Tag der Infektion wurde als Tag 0 des Versuchs festgelegt.

1.5. Klinische Untersuchung

Über den gesamten Versuchszeitraum von 90 Tagen wurde bei jedem Tier täglich eine klinische Untersuchung durchgeführt. Es wurde die innere Körpertemperatur ermittelt, Verhalten, Atmung und Futteraufnahme kontrolliert, sowie Haut und Ohrränder auf Veränderungen (Zyanosen, *Morbus maculosus*, Ikterus etc.) überprüft. Jeder Veränderung wurde ein Punkt („score“) zugewiesen, welcher vorher in einem definierten Bewertungssystem (Anhang XI.1.) festgelegt wurde. Die Summe der für die einzelnen Parameter vergebenen Punkte ergab den Gesamtscore des Tieres zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt.

Ab einem Gesamtscore von drei (akute IAP (STADLER et al., 2014)) wurden Therapiemaßnahmen eingeleitet. Es wurde Oxytetracyclin (Terramycin®/LA 20 mg/kg KGW, Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland) intramuskulär injiziert. Bei Fieber $> 40^{\circ}\text{C}$ wurde zusätzlich parenteral Metamizol (Novaminsulfon® 0,3-1 ml/10kg KGW, bela-pharm GmbH & Co. KG, Vechta, Deutschland) appliziert. Bei erniedrigtem Glukosespiegel wurde oral Glukose in Form von Ursolyt® G (35 g in 1 l Wasser, Serumwerk Bernburg, Bernburg, Deutschland) verabreicht. Bei Erreichen der Abbruchkriterien (trotz antibiotischer Therapie über 48h ein gleichbleibender klinischer Score ≥ 3 ; anhaltendes Fieber $\geq 40^{\circ}\text{C}$, gestörte Futteraufnahme, gestörtes Allgemeinbefinden), wurde das Tier euthanasiert. Die Euthanasie erfolgte intravenös mit Pentobarbital (Release® 500 mg/ml, bis 30 kg: 450 mg/5 kg KGW, ab 30 kg: 450 mg/10 kg, WDT, Garbsen, Deutschland).

1.6. Probenentnahme

1.6.1. Blutprobenentnahme

Die Entnahme von Blutproben erfolgte in den ersten 10 Versuchstagen alle zwei Tage, anschließend bis zum Ende des Versuchs nach 90 Tagen einmal wöchentlich.

Tiere unter 25–30 kg KGW wurden von einer Hilfsperson in Rückenlage fixiert, die Blutentnahme erfolgte bis zu einem Gewicht von 15 kg aus der *V. cava cranialis*, bei einem Gewicht > 15 kg aus der *V. jugularis externa dexter*. Ab einem Gewicht von 30 kg wurden die Tiere stehend in der Oberkieferschlinge fixiert, die Blutentnahme erfolgte ebenfalls aus der *V. jugularis externa dexter*. Es wurden jeweils eine Serummonovette (Primavette®S 7,5 ml, KABE Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland) und zwei EDTA Röhrchen (Primavette® K3E 2,6 ml, KABE Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland) mit aufgesetzten Einmalkanülen 1.10 x 50 mm und 19 G (Sterican® B., Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) verwendet. Die Kanülengröße wurde bei größeren Tieren auf 1,20 x 75 mm angepasst.

1.6.2. Pathologische Untersuchung und Probenentnahme

Alle Tiere wurden intravenös mit Pentobarbital (Release® 500 mg/ml, bis 30 kg: 450 mg/5 kg KGW, ab 30 kg: 450 mg/10 kg, WDT, Garbsen, Deutschland)

euthanasiert. Die Tiere aus Gruppe I wurden anschließend pathologisch-anatomisch und histopathologisch untersucht. Die Sektion erfolgte am Institut für Tierpathologie der LMU München. Die Probenentnahme für die histopathologische und immunhistochemische Untersuchung wurde nach einem vorher definierten Probenentnahmeprotokoll (Anhang XI.2.) durchgeführt. Bei Bedarf wurde am Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen der LMU München, Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie, eine bakteriologische Untersuchung veränderter Organe durchgeführt. Zum Ausschluss einer bakteriellen Meningitis wurde bei allen Tieren eine sterile Tupferprobe des Gehirns genommen und eine bakteriologische Untersuchung eingeleitet.

2. Probenbearbeitung

2.1. Mikroskopische Untersuchung der Blutausstriche

Von allen EDTA-Blutproben wurden Ausstriche angefertigt, mit Acridinorange gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch auf *M. suis* untersucht.

Acridinorange-Färbung

1. EDTA-Blut dünn auf Objektträger ausstreichen
2. vollständig trocknen lassen
3. 40 Sekunden in 96 % Ethanol fixieren
4. 24 Stunden bei Raumtemperatur trocknen lassen
5. 60 Minuten in Acridinorange-Gebrauchslösung (Anhang XI.8.2.) färben
6. in Aqua dest. schwenken

Die fertig gefärbten und getrockneten Ausstriche wurden unter Ölimmersion bei 600-facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop begutachtet.

2.2. Hämatologische Untersuchungen

Die hämatologische Blutuntersuchung erfolgte im Labor der Klinik für Schweine der LMU München mittels des vollautomatischen Blutkörperchenzählgeräts Animal Blood Counter (Scil Vet abc, scil animal care company GmbH, Viernheim,

Deutschland). Aus dem EDTA-Blut wurden die Erythrozyten- und Leukozytenzahl, der Hämoglobingehalt, der Hämatokrit, MCH, MCV und MCHC bestimmt bzw. errechnet. Das restliche EDTA-Blut wurde in 2 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Wesseling) überführt und bei – 70 °C gelagert.

2.3. Klinisch-chemische Blutuntersuchungen

Die klinisch-chemische Blutuntersuchung wurde im Labor der Klinik für Wiederkäuer der LMU München in Oberschleißheim photometrisch mittels eines automatischen Analysegerätes (Autoanalyzers für klinische Chemie; Hitachi cobas® c 311, Roche, Mannheim, Deutschland) durchgeführt.

Durch 10-minütige Zentrifugation der Serummonovetten (Primavette®S 7,5 ml KABE Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland) bei 3000 U/min (Rotana 460R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen) wurde Serum gewonnen und anschließend in 2 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Wesseling) überführt. Es wurden die Serumparameter Glukose, Gesamtbilirubin, direktes Bilirubin, Harnstoff, Kreatinin, Albumin, Eisen, Natrium, Kalium, Chlorid, Calcium, Phosphat, Magnesium und die Enzyme CK, AP, AST und γ -GT bestimmt.

Das restliche Serum wurde in 2 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Wesseling) überführt und bei – 70 °C gelagert.

2.4. *M. suis*-spezifische quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion

Die *M. suis*-spezifische PCR wurde im Labor des Instituts für Nutztierwissenschaften, Fachgebiet Infektions- und Umwelthygiene bei Nutztieren der Universität Hohenheim durchgeführt.

Es wurden alle EDTA-Blutproben der Tiere aus Gruppe I und Gruppe II sowie zusätzlich Proben verschiedener Organe (Leber, Lunge, Niere, Knochenmark, Lymphknoten und Gehirn) der Tiere aus Gruppe I quantitativ auf das Vorhandensein von *M. suis*-DNA untersucht.

Zunächst wurde die *M. suis*-DNA mit dem GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) nach Herstellervorgaben aus den Blut- und Organproben extrahiert. Von den Organproben wurden je 200 mg Gewebe eingewogen, mit 800 μ l Aqua dest. versetzt und im FastPrep FP120 Cell Disrupter (Thermo Savant, Qbiogene Inc, Illkirch, France) homogenisiert. Die DNA-Extraktion erfolgte anschließend aus 200 μ l der homogenisierten Flüssigkeit

bzw. bei den Blutproben aus 200 µl EDTA-Blut.

Die anschließende Detektion und Quantifizierung der *M. suis*-DNA wurde nach dem Protokoll von HOELZLE und Mitarbeitern (2007d) mithilfe des StepOne™ Real-time PCR Systems (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte nach definierten Standards, bei den Blutproben als *M. suis*/ml Blut und bei den Organproben als *M. suis*/g Gewebe.

Die Ergebnisse der *M. suis*-spezifischen PCR der zum Zeitpunkt der Euthanasie entnommenen EDTA-Blutproben und der Organproben von Leber, Lunge, Niere und Gehirn wurden in Anlehnung an TASKER und Mitarbeiter (2009) miteinander verglichen. Hierzu wurde zunächst das erwartete Blutvolumen in den Organen errechnet. Dies erfolgte auf Basis des Herzminutenvolumens und der Ruhedurchblutung der Organe. Das Herzminutenvolumen eines Schweines beträgt 110 ml/kg KGW/min (THAI, 2012). In Abbildung 4 ist die Ruhedurchblutung der Organe als Anteil des Herzminutenvolumens in Prozent dargestellt. Anhand des errechneten Blutvolumens im Organ und der gemessenen Erregermenge im Blut wurde die allein durch die Organdurchblutung zu erwartende Erregermenge pro Organ bestimmt und diese auf 1 g Organ heruntergerechnet, um einen Vergleich mit den Ergebnissen der *M. suis*-spezifischen quantitativen PCR der Organproben zu ermöglichen.

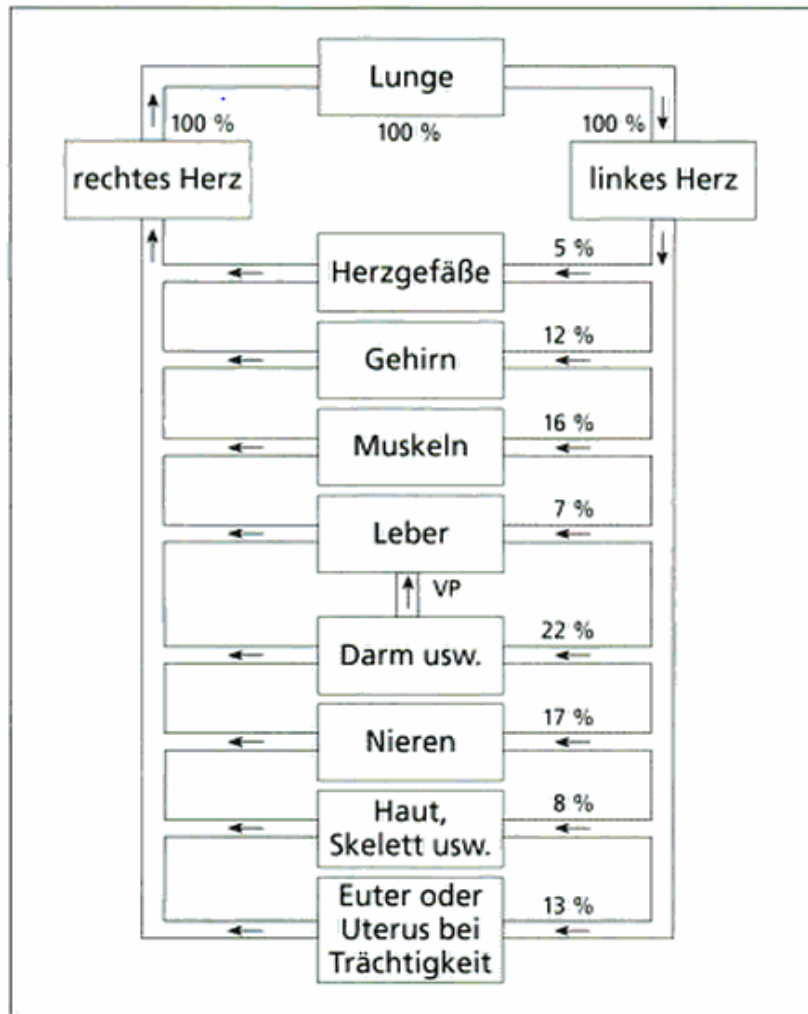


Abbildung 4: Schema der Ruhedurchblutung der Organe. Die Prozentzahlen geben den Anteil des Herzminutenvolumens an, der durch die jeweiligen Organgebiete fließt (V. ENGELHARDT, 2000).

Tabelle 1: Gewicht der Organe Leber, Lunge, Gehirn und Nieren in % des Körpergewichts

Organ	Gewicht in % des KGW	Quelle
Leber	1,56	STARY (1956)
Lunge	1–1,5	ACKERKNECHT (1977b)
Gehirn	0,1–0,3	ACKERKNECHT (1977a)
Nieren	0,5	FROMM und HIERHOLZER (2000)

2.5. Histopathologische Untersuchung

Die histopathologische Untersuchung wurde am Institut für Tierpathologie der LMU München durchgeführt. Die nachfolgend aufgeführten Geräte und Lösungen finden sich entsprechend ihres Verweises (z.B. XI.3.) im Anhang ab Seite 129. Die Verbrauchsmaterialien sind direkt mit Herstellerangaben benannt.

Die Proben für die histopathologische Untersuchung von Gruppe I wurden nach dem unter Anhang XI.2. aufgeführten Protokoll entnommen, sofort in 4 %iges Paraformaldehyd (Anhang XI.3.1.) verbracht und auf einem Taumler¹ (Anhang XI.9.) bei 4 °C für 24 Stunden fixiert. Anschließend wurden sie in ca. 3 mm dicke und 1 cm² große Gewebestücke geschnitten, in Einbettungskassetten verbracht und in Paraffin (Sherwood Medical, St. Louis, USA) eingebettet. Gewebeproben von Leber, Lunge, Niere und Knochenmark wurden zusätzlich in Kunststoff eingebettet.

2.5.1. Einbettungsverfahren

Paraffin-Einbettung

Die Proben wurden in einem Entwässerungsautomaten² (Anhang XI.9.) wie folgt entwässert:

1. 30 Minuten spülen mit Aqua dest.
2. 2 × 90 Minuten 70 %iges Ethanol
3. 2 × 90 Minuten 96 %iges Ethanol
4. 2 × 90 Minuten 100 %iges Ethanol
5. 2 × 30 Minuten Xylol
6. 90 Minuten Xylol
7. 2 Stunden Paraffin 60 °C
8. 3 Stunden Paraffin 60 °C

Anschließend erfolgte das Außgießen in Paraffinblöcke in einem Paraffineinbettungs-System⁴ (Anhang XI.9.).

Kunststoffeinbettung

Die Proben wurden nach der Fixierung für drei Stunden in einer Spülflüssigkeit (Anhang XI.4.1.) gewaschen und in einem Entwässerungsautomaten³ (Anhang XI.9.) folgendermaßen entwässert:

1. 2 × 1 Stunde 30 %iges Ethanol
2. 2 × 1 Stunde 50 %iges Ethanol
3. 2 × 2 Stunden 70 %iges Ethanol
4. 2 × 2 Stunden 96 %iges Ethanol
5. 2 × 3 Stunden 96 %iges Ethanol

Danach wurden die Proben für 24 h bei 4 °C auf einem Taumler¹ (Anhang XI.9.) in einem 1 : 1 Gemisch aus Methacrylsäure-2-hydroxyethylester (GMA, Fluka-Nr. 64170) und Methacrylsäuremethylester (MMA, Fluka-Nr. 64200) inkubiert. Anschließend wurden sie in das Einbettungsmedium (Anhang XI.4.2.) verbracht und in diesem 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Polymerisation fand in luftdicht verschließbaren Polyethylen-Probenbehältern statt, pro 40 ml Einbettungsmedium wurden hierfür 60 µl N,N-Dimethylanilin (Merck, Darmstadt) zugegeben. Die Ableitung der Polymerisationswärme erfolgte in einem gekühlten Wasserbad.

2.5.2. Anfertigung und Färbung der Paraffinschnitte

Es wurden 4–5 µm dicke Schnitte an einem Rotationsmikrotom⁵ (Anhang XI.9.) angefertigt, ins Wasserbad⁷ (Anhang XI.9.) verbracht und auf Objektträger (Starfrost, Engelbrecht, Edermünde) aufgezogen. Anschließend erfolgte eine Trocknung für 24 Stunden bei 40 °C in einem Trockenschrank⁸ (Anhang XI.9.).

Die Schnitte wurden mit der Hämalaun-Eosin-Färbung gefärbt.

Hierzu erfolgte zuerst eine 15-minütige Entparaffinierung in Xylol (SAV-Liquid-Production, Flintsbach a. Inn) und eine Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe mit Ethanol (Anhang IX.5.1.) (100 %, 96 %, 70 %, Aqua dest.). Anschließend konnten die Schnitte gefärbt werden.

Hämalaun-Eosin-Färbung

1. 5 Minuten in Mayers Hämalaun (Merck, Darmstadt) einstellen
2. 5 Minuten in warmem Leitungswasser bläuen
3. Bei Überfärbung Differenzieren in 0,5 %iger HCl-Ethanol-Lösung (Anhang XI.3.2.2.)
4. 5 Minuten warm wässern
5. 2–7 Mal in 1 %ige Eosin-Lösung (Anhang XI.5.2.3.) eintauchen
6. Mit Aqua dest. Spülen
7. In aufsteigender Alkoholreihe mit Ethanol (Anhang XI.5.1.) dehydrieren (Aqua dest., 70 %, 96 %, 100 %)
8. Einstellen in Xylol (SAV-Liquid Production, Flintsbach a. Inn)
9. Eindecken mit Histokitt (Hecht-Assistent, Sondheim)

2.5.3. Anfertigung und Färbung der Kunststoffsnitte

Die Schnitte wurden an einem Hartschnitt-Rotationsmikrotom⁶ (Anhang XI.9.) angefertigt und anschließend auf einer Heizplatte⁹ (Anhang XI.9.) getrocknet.

Es erfolgten eine Hämalaun-Eosin-Phloxin-Färbung und eine Färbung nach Giemsa.

Hämalaun-Eosin-Phloxin-Färbung

1. 5 Minuten Mayers Hämalaun (Merck, Darmstadt)
2. 10 Minuten in Leitungswasser bläuen
3. Differenzieren in 1 %iger HCl-Ethanol-Lösung (Anhang XI.6.1.1.)
4. 10 Minuten wässern
5. Trocknen auf der Heizplatte⁹ (Anhang XI.9.) bei 60 °C
6. 20 Minuten Eosin-Phloxin-Gebrauchslösung (Anhang IX.6.1.4.)
7. Spülen in Aqua dest.
8. Trocknen auf der Heizplatte⁹ (Anhang XI.9.) bei 60 °C

9. Einstellen in Xylol (SAV-Liquid Production, Flintsbach a. Inn)

10. Eindecken mit Histokitt (Hecht-Assistent, Sondheim)

Färbung nach Giemsa

1. 1 Stunde in 7 %ige Giemsa-Gebrauchslösung (Anhang XI.6.2.1.) im Wasserbad bei 65 °C einstellen

2. Spülen in Aqua dest.

3. Differenzieren in 0,5 %iger Essigsäure (Anhang XI.6.2.2.) bis zum Farbumschlag von blau nach rot

4. Spülen in Aqua dest.

5. Trocknen auf der Heizplatte⁹ (Anhang XI.9.)

6. Einstellen in Xylol (SAV-Liquid Production, Flintsbach a. Inn)

7. Eindecken mit Histokitt (Hecht-Assistent, Sondheim)

2.6. Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie diente ein polyklonales Kaninchenserum, gerichtet gegen die α -Enolase von *M. suis* als Primärantikörper. Hergestellt und zur Verfügung gestellt wurde es vom Labor des Instituts für Nutztierwissenschaften, Fachgebiet Infektions- und Umwelthygiene bei Nutztieren der Universität Hohenheim.

Immunhistochemieprotokoll der Paraffinschnitte

1. Trocknung der Schnitte über Nacht im Trockenschrank⁸ (Anhang XI.9.) bei 37 °C

2. 15 Minuten Entparaffinierung in Xylol (SAV-Liquid Production, Flintsbach a. Inn)

3. Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe mit Ethanol (Anhang XI.5.1.) (100 %, 96 %, 70 %, Aqua dest.)

4. Demaskierung in der Mikrowelle mit 10 mM Citratpuffer (Anhang XI.7.1.) pH 6,2 x 10 min bei 700 Watt

5. 15 Minuten Blockierung der endogenen Peroxidase mit 1%igem

Wasserstoffperoxid (Anhang XI.7.3.)

6. 10 Minuten Spülen in TBS (Anhang XI.7.2.)
7. 30 Minuten Absättigung von unspezifischen Bindungen mit Ziegennormalserum, Verdünnung 1 : 10 (MP Biomedicals, Eschwege)
8. Übernacht Inkubation bei 4 °C mit dem Primärantikörper, 1 : 200 verdünnt in TBS (Anhang XI.7.2.)
9. 10 Minuten Spülen in TBS (Anhang XI.7.2.)
10. 50 Minuten Inkubation mit dem Sekundärantikörper, biotinylierter Ziege anti-Kaninchen-IgG (Vector, Burlingame, USA), Verdünnung 1 : 200 in TBS (Anhang XI.7.2.)
11. 10 Minuten Spülen in TBS (Anhang XI.7.2.)
12. 30 Minuten Inkubation mit Peroxidase markiertem Avidin-Biotin-Komplex (Vector, Burlingame, USA), 1 : 100 verdünnt mit TBS (Anhang XI.7.2.)
13. 10 Minuten Spülen in TBS (Anhang XI.7.2.)
14. 5 Minuten Inkubation mit DAB-Gebrauchslösung (Anhang XI.7.4.)
15. 5 Minuten Spülen in Leitungswasser
16. 10–15 Sekunden Färben in Mayers Hämalaun (Merck, Darmstadt)
17. 5 Minuten Bläuen in Leitungswasser
18. Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe mit Ethanol (Anhang XI.5.1.) (Aqua dest., 70 %, 96 %, 100 %)
19. Einstellen in Xylol (SAV-Liquid Production, Flintsbach a. Inn)
20. Eindecken mit Histokitt (Hecht-Assistent, Sondheim)

2.7. Anfertigung der pathologisch-anatomischen und histopathologischen Abbildungen

Alle pathologisch-anatomischen und histopathologischen Abbildungen wurden freundlicherweise vom Institut für Tierpathologie der LMU München (Univ.-Prof. Dr. W. Hermanns) angefertigt und zur Verfügung gestellt.

2.8. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen Microsoft Office Excel und IBM SPSS Statistics 20. Die hämatologischen und klinisch-chemischen Parameter wurden mittels deskriptiver Statistik ausgewertet. Sie umfasste die Berechnung des Mittelwerts, sowie der Standardabweichung (SD) und des Standardfehlers (SEM) des Mittelwerts.

IV. ERGEBNISSE

1. Klinische Untersuchung

Die Tiere beider Versuchsgruppen wurden ab dem Tag der Einstellung täglich klinisch untersucht und anhand eines Score-Systems (Anhang XI.1.) bewertet.

1.1. Splenektomierte, subkutan infizierte Tiere (Gruppe I)

Vom Tag der Einstellung bis einschließlich Tag 6 *post infectionem* (p. i.) konnten bei keinem der Tiere klinische Veränderungen festgestellt werden (Gesamtscore 0).

An Tag 7 bzw. 8 p. i. zeigten insgesamt drei Tiere (Tier 23, 32 und 76) Anzeichen einer akuten IAP mit gestörtem Allgemeinbefinden, Fieber bis 41,4 °C, Apathie, Anorexie und den bei einer *M. suis*-Infektion beschriebenen Hautveränderungen wie *Morbus maculosus*, Ikterus und Zyanosen der Ohrränder (Abb. 5 und 6).



Abbildung 5: Hochgradige Ohrrandzyanosen bei Tier 32



Abbildung 6: *Morbus maculosus* bei Tier 23 an Tag 7 p.i.

Bei zwei der Tiere (Tier 32 und 76) zeigten sich zusätzliche Krankheitserscheinungen wie tonische Krämpfe, schwankender Gang, Tremor, Lidödeme und Dyspnoe. Es ergab sich bei allen drei Tieren ein Gesamtscore von 7. Aus tierschutzrechtlichen Gründen wurden zwei Tiere (Tier 23 und 32) euthanasiert, ein weiteres Tier (76) verendete in der Nacht von Tag 7 auf Tag 8 *post infectionem*.

Die anderen vier Tiere zeigten erstmals an den Tagen 13–15 p. i. Symptome einer IAP (Gesamtscore 1–2) in Form von Ohrrandzyanosen und geringgradigem *Morbus maculosus*. Diese entwickelten sich zwischen den Tagen 16 und 18 p. i. zu einem akuten Anfall mit Fieber und hochgradig gestörtem Allgemeinbefinden.

Tier 73 zeigte an Tag 17 p. i. Fieber bis 41,6 °C, Anorexie, Dyspnoe, blasse Haut mit flächigen Ekchymosen an beiden Ohren (Abb. 7) und Tremor. Das Tier wurde noch am selben Tag mit einem Gesamtscore von 9 euthanasiert.



Abbildung 7: Ekchymosen am Ohr von Tier 73

Tier 74 wurde an Tag 20 p. i. trotz antibiotischer und antiphlogistischer Therapie bei einem Gesamtscore von 10 (hochgradiger Ikterus, *Morbus maculosus*, Anorexie, hochgradig verstärkte Atmung, Untertemperatur) und in Seitenlage festliegend euthanasiert.

Tier 31 zeigte an Tag 18 p.i. ebenfalls Fieber bis 41,3 °C, ein reduziertes Allgemeinbefinden, Anorexie, eine verstärkte Atmung und eine generalisierte fleckige Rötung der Haut (Gesamtscore von 7). Es stabilisierte sich aber durch die antibiotische und antiphlogistische Therapie und war bereits am nächsten Tag bei gutem Allgemeinbefinden (Gesamtscore von 0). Es entwickelte an Tag 23 p. i. und an Tag 30 p.i. zwei weitere akute Anfälle mit Fieber, reduziertem Allgemeinbefinden, Ohrrandzyanosen und *Morbus maculosus*. Tier 31 wurde an Tag 41 p. i. im vierten Anfall mit einer Körpertemperatur von 41,5 °C, hochgradig reduziertem Allgemeinbefinden, motorischen Ausfällen und mittelgradigem *Morbus maculosus* an Bauch und Hintergliedmaßen (Gesamtscore von 8) euthanasiert. Das Tier zeigte ab Tag 18 p.i. bis zum Tag der Euthanasie eine erhöhte Blutungsneigung nach Injektion oder Blutentnahme. Der *Morbus maculosus* trat in diesem Fall auch zwischen den akuten, fiebrigen Anfällen auf (Gesamtscore von 3 an den Tagen 14, 15, 16, 28, 35 und 38 p.i., Abb. 8).

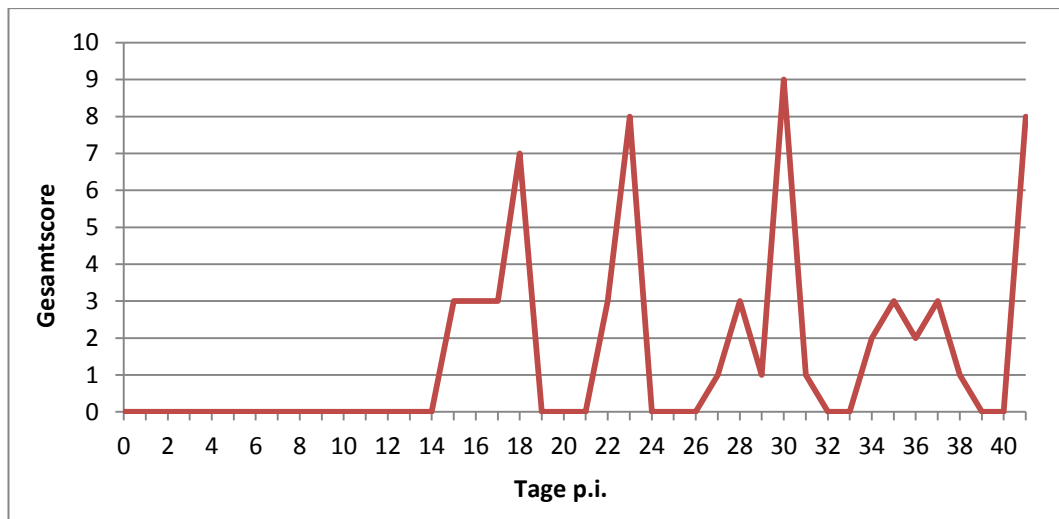


Abbildung 8: Verlauf des klinischen Gesamtscores über 41 Tage von Tier 31

Bei Tier 71 konnten bis zum Versuchstag 23 p. i. ausschließlich geringgradige Symptome einer IAP wie stecknadelkopfgroße Petechien an den Ohren, eine erhöhte Blutungsneigung und geringgradige Ohrrandzyanosen festgestellt werden. An den Tagen 23, 32, 49 und 60 p. i. waren Fieber (Abb. 9), reduziertes Allgemeinbefinden, verminderte Futteraufnahme und Ohrrandzyanosen erkennbar (Gesamtscore 3–5). An Tag 60 p. i. zeigte sich außerdem Erbrechen. Trotz antibiotischer und antiphlogistischer Therapie kam es nach Tag 60 p. i. zu keiner Besserung des Allgemeinzustandes. An Tag 62 p. i. traten zusätzlich klonisch-tonische Krämpfe auf, das Tier wurde euthanasiert.

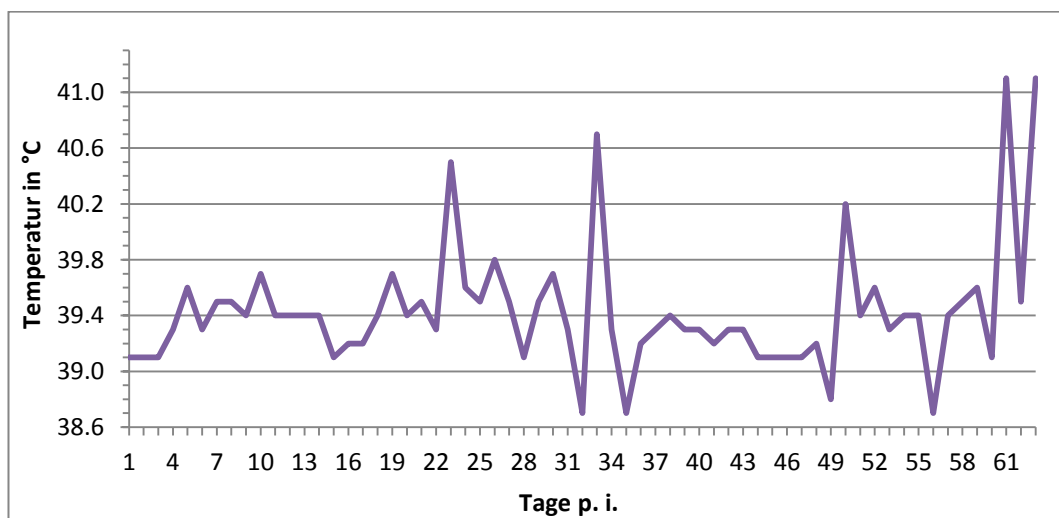


Abbildung 9: Verlauf der Körpertemperatur über 62 Tage von Tier 71

1.2. Splenektomierte, oral infizierte Tiere (Gruppe II)

Bei der klinischen Untersuchung der sieben Tiere aus Gruppe II konnten über den gesamten Versuchszeitraum von 90 Tagen keine Anzeichen, die auf eine klinische IAP hindeuten, festgestellt werden. Der Gesamtscore der klinischen Untersuchung belief sich bei fünf Tieren (Tier 33, 64, 65, 66 und 68) über den gesamten Versuchszeitraum auf 0. Tier 64 entwickelte an Tag 3 p. i. eine Infektion der Splenektomiewunde und wurde antibiotisch behandelt (Vetriproc 30 %[®], 1ml/10kg KGW, CEVA Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf). Bei Tier 34 konnte an Tag 8 p. i. eine erhöhte Körperinnentemperatur von 40,2 °C und somit ein klinischer Gesamtscore von 1 festgestellt werden. Tier 37 entwickelte an Tag 44 p. i. Fieber. Beide Tiere wurden antibiotisch und antiphlogistisch behandelt und zeigten bereits am nächsten Tag keine klinischen Auffälligkeiten mehr.

2. *M. suis*-Konzentration im Blut

2.1. Quantitative Analyse

Vor der experimentellen Infektion wurden EDTA-Blutproben aller Tiere beider Versuchsgruppen mittels quantitativer real-time PCR auf *M. suis* untersucht, um eine Feldinfektion auszuschließen. Die Untersuchung verlief bei allen Tieren negativ.

2.2. Splenektomierte, subkutan infizierte Tiere (Gruppe I)

An Tag 2 p. i. wiesen die Blutproben aller Tiere der Gruppe I ein *M. suis*-negatives Ergebnis in der PCR auf. An Tag 4 p. i. konnte bei 3 Tieren (Tier 23, 74 und 76) *M. suis*-DNA im Blut nachgewiesen werden, an Tag 6 p. i. waren die Blutproben aller Tiere *M. suis* positiv. Die höchste Erregermenge wurde mit $4,8 \times 10^7$ *M. suis*/ml Blut in der Blutprobe von Tier 32 an Tag 8 p. i. nachgewiesen (Tabelle 2).

In Abbildung 10 ist die Erregermenge in den Blutproben der einzelnen Tiere im zeitlichen Verlauf dargestellt. Bei den bereits an den Tagen 7 bzw. 8 p.i. euthanasierten (Tier 23 und 32) oder verendeten (Tier 76) Tieren ist ein deutlicher Anstieg der Erregermenge im Blut zum Zeitpunkt der akuten IAP ab Tag 6 p.i. ersichtlich. Bei Tier 73 war ein Anstieg der Erregermenge erst ab Tag 14 p.i., aber ebenfalls im Zusammenhang mit den ersten klinischen Anzeichen einer akuten IAP nachweisbar. Die Erregermenge im Blut von Tier 74 sank an Tag 20 p.i. trotz des

hohen klinischen Gesamtscores wieder ab. Bei den Tieren 31 und 71 zeigte sich ein wellenförmiger Verlauf der Bakteriämie.

Tabelle 2: Erregermenge im Blut der splenektomierten, subkutan infizierten Tiere in den ersten 21 Tagen p. i.

Tage p. i.		d -2	2	4	6	7	8	14	17	20	21
Tier ID	23	neg.	neg.	1,1x10 ¹	2,3x10 ⁶	1,8x10 ⁷	†	†	†	†	†
	31	neg.	neg.	neg.	5,3x10 ¹	-	4,6x10 ⁴	7,2x10 ⁵	-	-	8,4x10 ⁶
	32	neg.	neg.	neg.	2,1x10 ⁵	-	4,8x10 ⁷	†	†	†	†
	71	neg.	neg.	neg.	1,8x10 ³	-	1,5x10 ⁷	9,7x10 ⁴	-	-	1,0x10 ⁶
	73	neg.	neg.	neg.	9,3x10 ¹	-	1,5x10 ⁵	1,8x10 ⁶	1,2x10 ⁷	†	†
	74	neg.	neg.	1,0x10 ³	3,3x10 ²	-	9,0x10 ⁴	1,1x10 ⁵	-	6,3x10 ⁴	†
	76	neg.	neg.	3,3x10 ²	5,6x10 ⁶	4,3x10 ⁷	†	†	†	†	†

- keine Probenentnahme, † Tier bereits verstorben

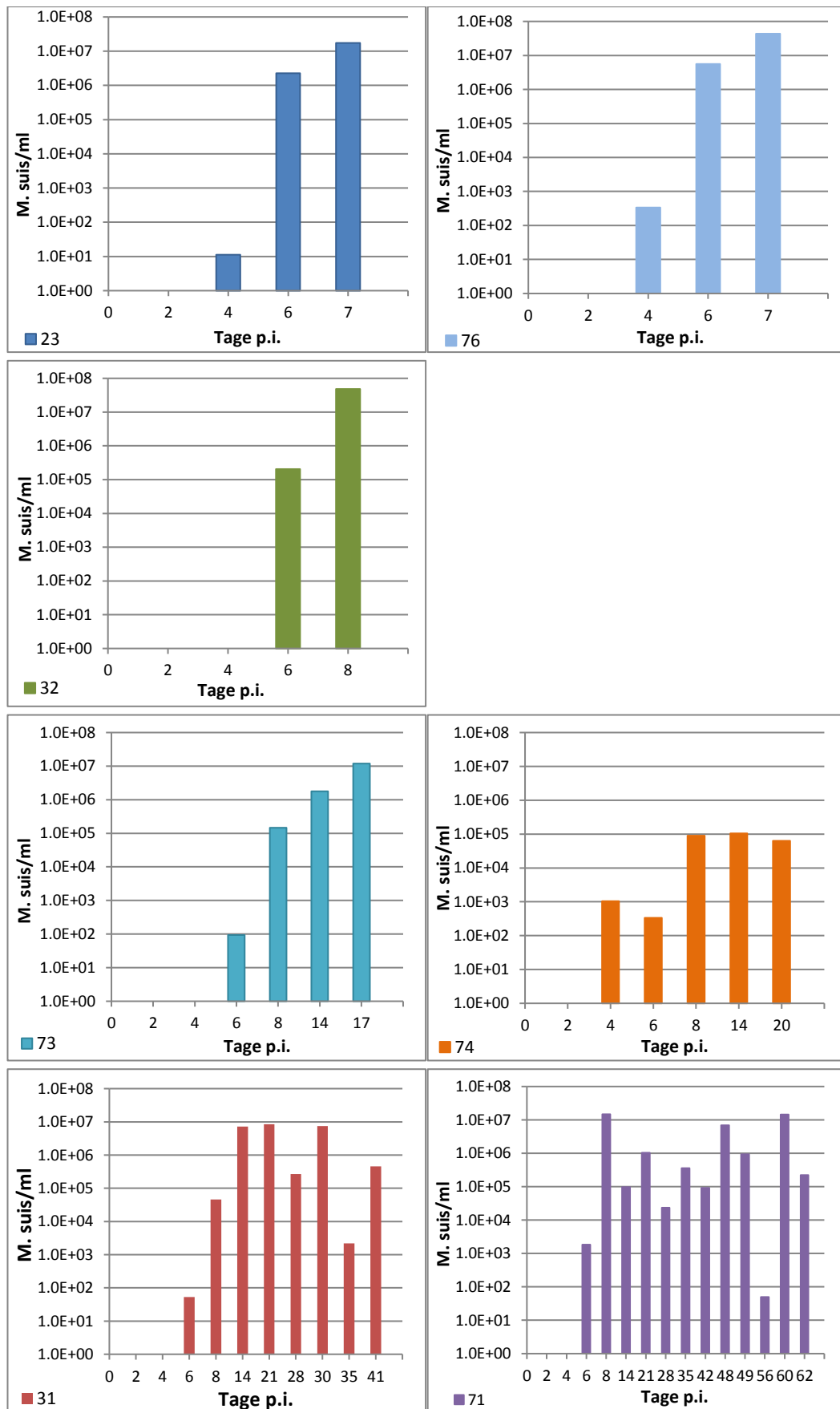


Abbildung 10: Erregermenge im Blut der Tiere aus Gruppe I im zeitlichen Verlauf, geordnet nach der Überlebenszeit in Tagen.

2.3. Splenektomierte, oral infizierte Tiere (Gruppe II)

Die Tiere der Gruppe II blieben zu allen Untersuchungszeitpunkten über den Versuchszeitraum von 90 Tagen in der quantitativen real-time PCR *M. suis*-negativ.

2.4. Mikroskopischer Erregernachweis

2.4.1. Splenektomierte, subkutan infizierte Tiere (Gruppe I)

Vor der Infektion sowie an den Tagen 2 und 4 p. i. konnte in keinem der mit Acridinorange gefärbten Blutaussstriche der subkutan infizierten Tiere *M. suis* nachgewiesen werden. An Tag 6 p. i. wurde bei drei Tieren (Tier 23, 32, 76) *M. suis* detektiert. Ab den Tagen 7 bzw. 8 p. i. wurden alle Tiere bis zum Ende des Untersuchungszeitraums als *M. suis* positiv bewertet.

In der vorliegenden Untersuchung konnte *M. suis* mittels mikroskopischem Erregernachweis im Acridinorange gefärbten Blutaussstrich ab einer, in der *M. suis*-spezifischen quantitativen PCR ermittelten, Erregermenge von $4,6 \times 10^4$ *M. suis*/ml Blut detektiert werden.

2.4.2. Splenektomierte, oral infizierte Tiere (Gruppe II)

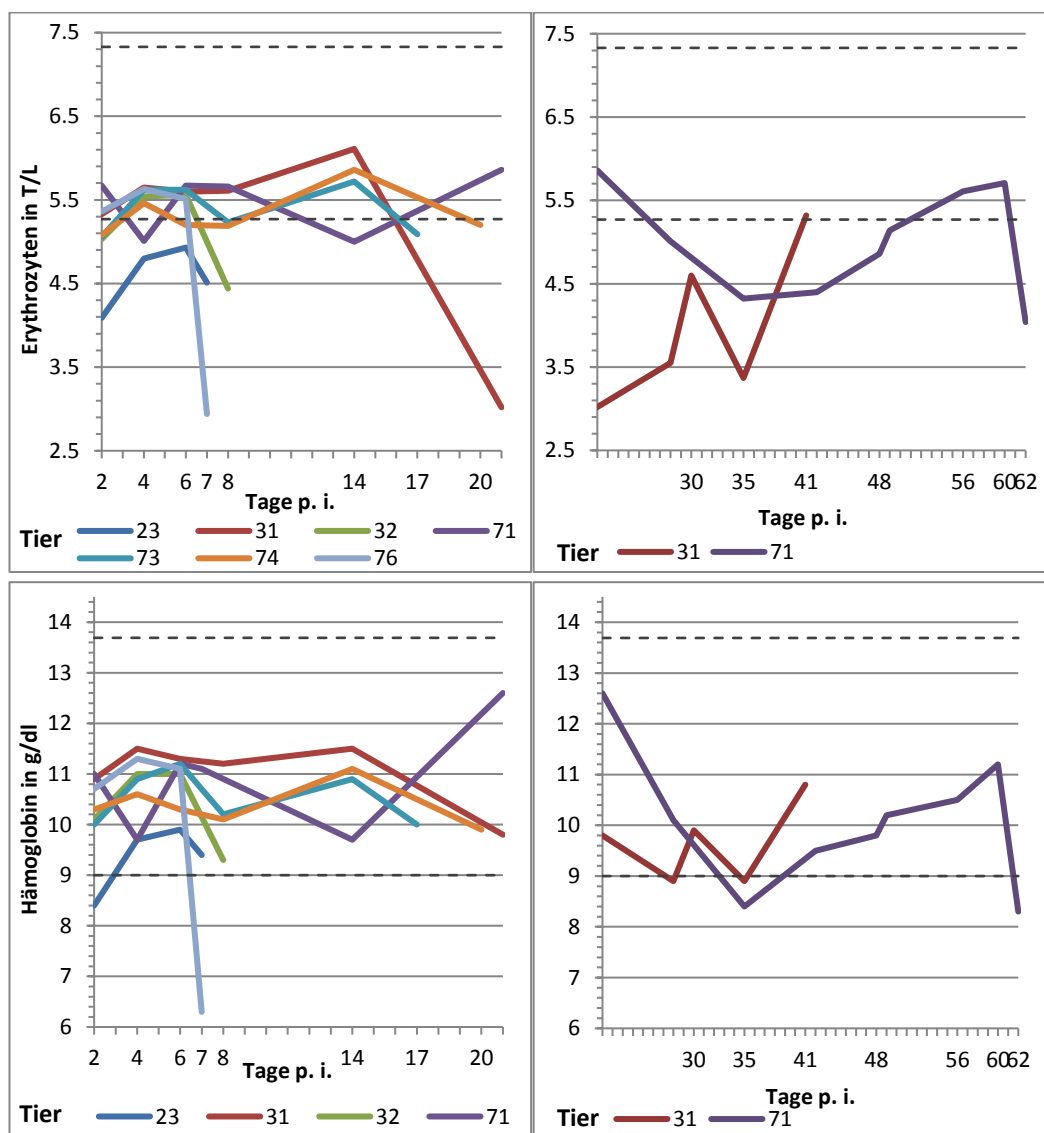
Bei den Tieren der Gruppe II konnte zu keinem Zeitpunkt *M. suis* in den Acridinorange-gefärbten Blutaussstrichen nachgewiesen werden.

3. Verlauf der hämatologischen Parameter

3.1. Splenektomierte, subkutan infizierte Tiere (Gruppe I)

Die Tiere der subkutan infizierten Gruppe wiesen jeweils zum Zeitpunkt einer akuten IAP die Anzeichen einer normochromen, normozytären Anämie auf. Die niedrigsten Werte konnten mit einer Erythrozytenzahl von 2,94 T/l, einer Hämoglobinkonzentration von 63 g/l und einem Hämatokrit von 17 % an Tag 7 p. i. bei Tier 76 gemessen werden. Die Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC) lag über den Untersuchungszeitraum im Mittel bei 22,11 mmol/l (SD \pm 1,18, SEM \pm 0,17) und somit geringgradig oberhalb des in der Literatur angegebenen Referenzbereiches von 17,59 mmol/l bis 21,81 mmol/l (NERBAS, 2008). Der Mittelwert des Mean Cell Volume (MCV) lag mit 57,37 fl (SD \pm 3,57,

In Abbildung 11 sind die hämatologischen Parameter Erythrozytenzahl, Hämoglobin und Hämatokrit der Gruppe I im zeitlichen Verlauf dargestellt.



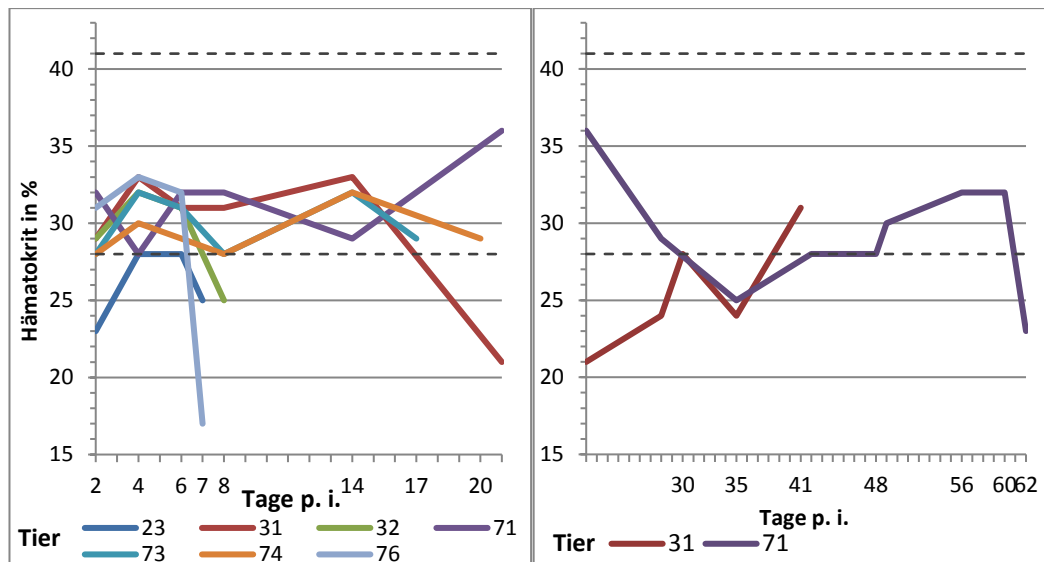


Abbildung 11: Verlauf der hämatologischen Parameter Erythrozytenzahl, Hämoglobin und Hämatokrit der Gruppe I über den Untersuchungszeitraum. Die gestrichelten Linien markieren die Referenzbereiche nach NERBAS (2008)

Bei Tier 31 konnte ab Tag 21 p. i. bis zum Zeitpunkt der Euthanasie am Rand des Probengefäßes eine feingrieselige Mikroagglutination des ungerinnbar gemachten Blutes festgestellt werden (Abb. 12).



Abbildung 12: Mikroagglutination an Tag 21 p. i. bei Tier 31

Der Mittelwert der Leukozytenzahl stieg von Tag 2 p. i. bis Tag 6 p. i. von 15,43 G/l ($SD \pm 4,35$, $SEM \pm 1,65$) auf 22,27 G/l ($SD \pm 6,79$, $SEM \pm 2,57$) an. Zum Zeitpunkt der ersten akuten IAP an Tag 7 und 8 p. i. war ein Absinken der Leukozytenzahl auf im Mittel 16,98 G/l ($SD \pm 2,09$, $SEM \pm 0,94$) nachzuweisen. Insgesamt verblieb der Mittelwert innerhalb des in der Literatur angegebenen Referenzbereichs von 10 G/l bis 26,4 G/l (NERBAS, 2008) (Abb. 13). Die höchste Leukozytenzahl wurde bei Tier 71 während des 3. akuten Anfalls an Tag 49 p. i. mit einem Wert von 40,7 G/l gemessen.

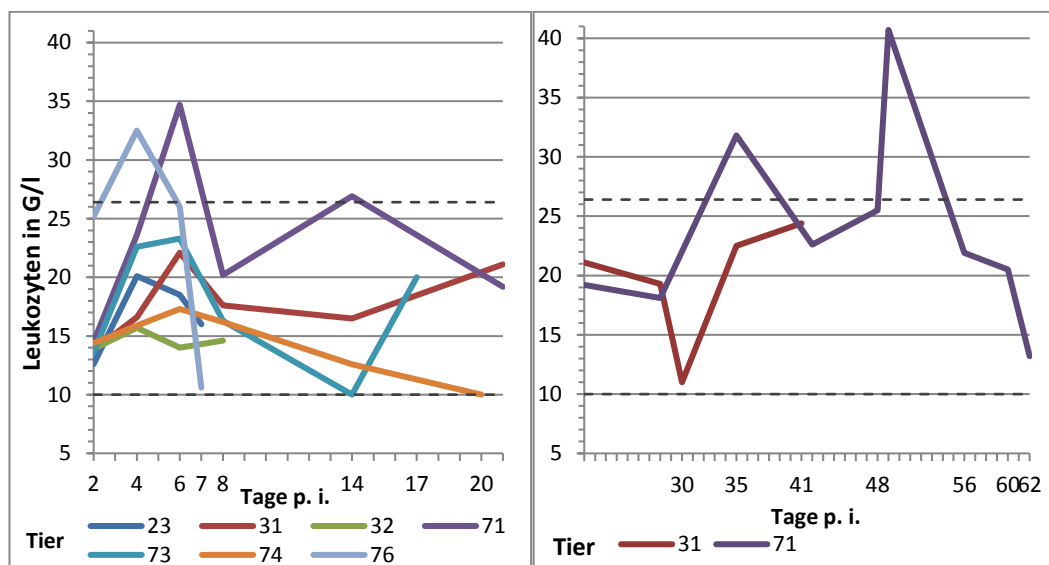


Abbildung 13: Leukozytenzahl der Gruppe I über den Untersuchungszeitraum. Die gestrichelten Linien markieren den Referenzbereich nach NERBAS (2008)

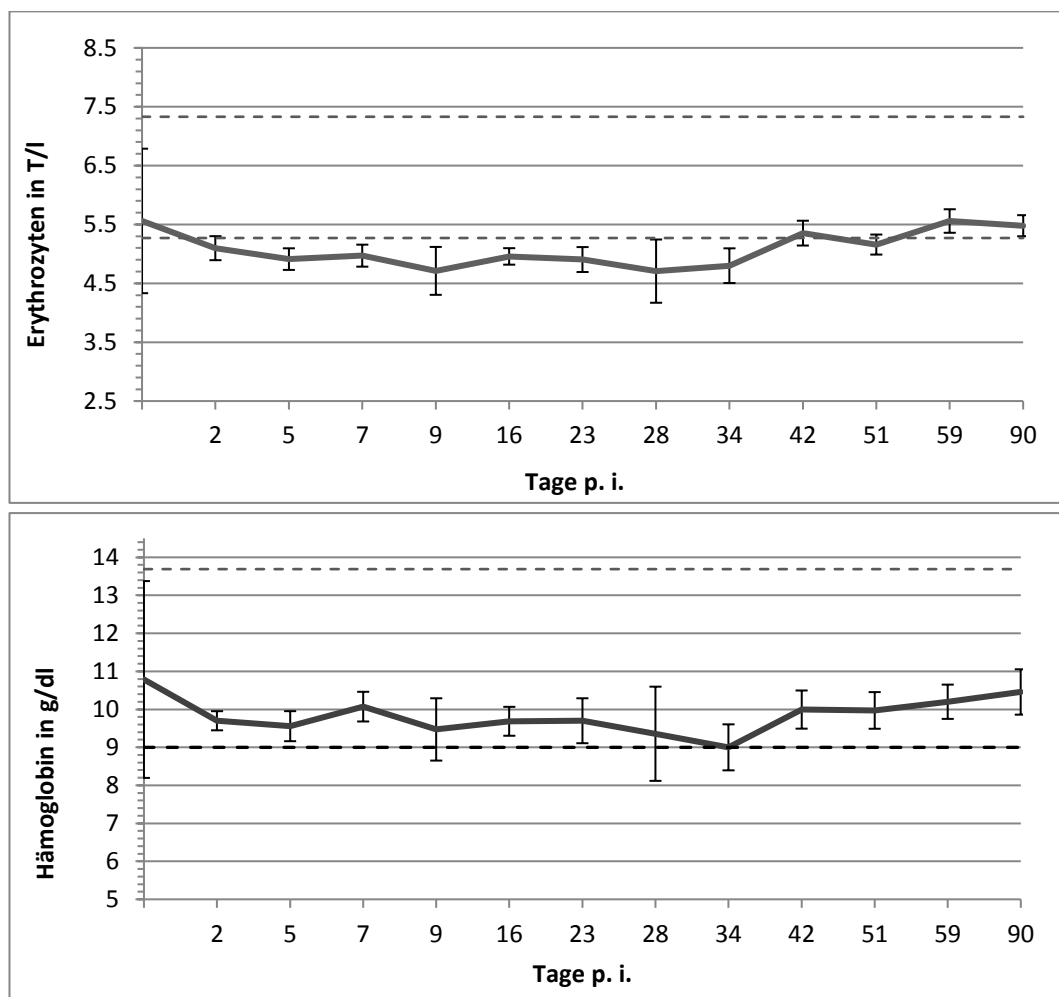
3.2. Splenektomierte, oral infizierte Tiere (Gruppe II)

Der Verlauf der hämatologischen Parameter Erythrozytenzahl, Hämoglobin und Hämatokrit der Gruppe II sind in Abbildung 14 als Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen und der Angabe des Referenzbereiches dargestellt.

Die Erythrozytenzahl lag mit einem Mittelwert von 5,56 T/l ($SD \pm 1,23$, $SEM \pm 0,46$) eine Woche vor der Splenektomie im unteren Bereich des von NERBAS (2008) genannten Referenzbereiches für Absetzferkel (5,27 T/l bis 7,33 T/l). Nach der Infektion belief sich die mittlere Erythrozytenzahl auf Werte zwischen 4,71 T/l ($SD \pm 0,54$, $SEM \pm 0,2$) und 5,09 T/l ($SD \pm 0,2$, $SEM \pm 0,08$). Ab Tag 42 p. i. befand sich der Mittelwert wieder innerhalb des genannten Referenzbereiches.

Der mittlere Hämatokrit in % lag vor der Splenektomie bei einem Wert von 32,29 % ($SD \pm 7$, $SEM \pm 2,65$). Im Zeitraum von Tag 9 p. i. bis Tag 42 p. i. konnte ein Abfall des mittleren Hämatokrits auf einen Wert geringgradig unterhalb des in der Literatur angegebenen Referenzbereiches gemessen werden. Der Minimalwert betrug 25,17 % ($SD \pm 1,57$, $SEM \pm 0,59$) an Tag 34 p. i. Der Referenzbereich für den Hämatokrit beim Absetzferkel liegt bei 28–41 % (NERBAS, 2008).

Die mittlere Hämoglobinkonzentration im Blut belief sich ab dem Zeitpunkt der Infektion bis zum Versuchsende an Tag 90 p. i. Werte auf zwischen 9,0 g/dl ($SD \pm 0,61$, $SEM \pm 0,23$) und 10,46 g/dl ($SD \pm 0,59$, $SEM \pm 0,23$) und lag somit im unteren Drittel des Referenzbereiches nach NERBAS (2008) (5,59-8,5 mmol/l bzw. 9-13,69 g/dl).



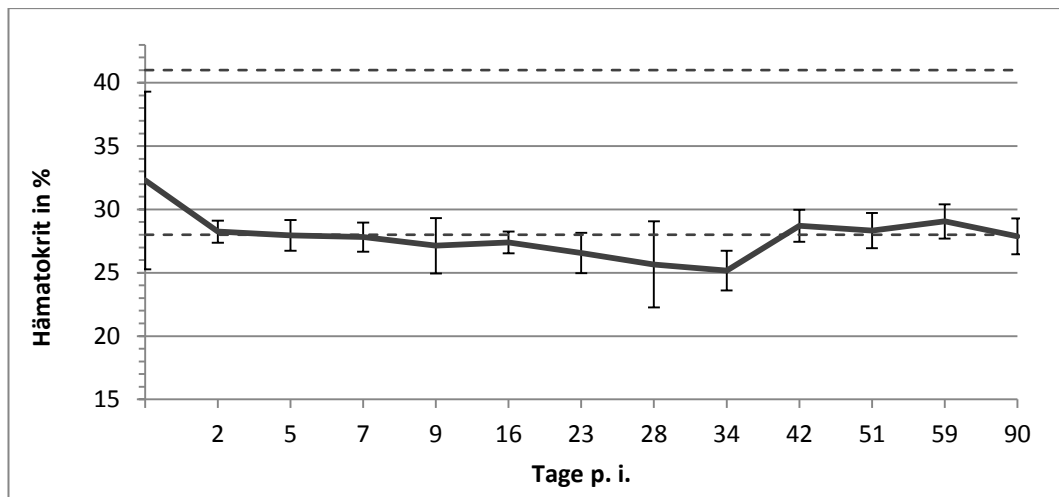


Abbildung 14: Verlauf und Standardabweichung der Mittelwerte der hämatologische Parameter Erythrozytenzahl, Hämoglobin und Hämatokrit der Gruppe II über den Versuchszeitraum von 90 Tagen. Die gestrichelten Linien markieren die Referenzbereiche nach NERBAS (2008)

Der Referenzbereich für die Leukozytenzahl im Blut liegt für Absetzferkel bei Werten von 10 bis 26,4 G/l. Mit Werten von 12,77 G/l ($SD \pm 4,24$, $SEM \pm 1,6$) bis 19,61 G/l ($SD \pm 4,22$, $SEM \pm 1,59$) lag die mittlere Leukozytenzahl der Gruppe II über den gesamten Versuchszeitraum innerhalb des Referenzbereiches (Abb. 15).

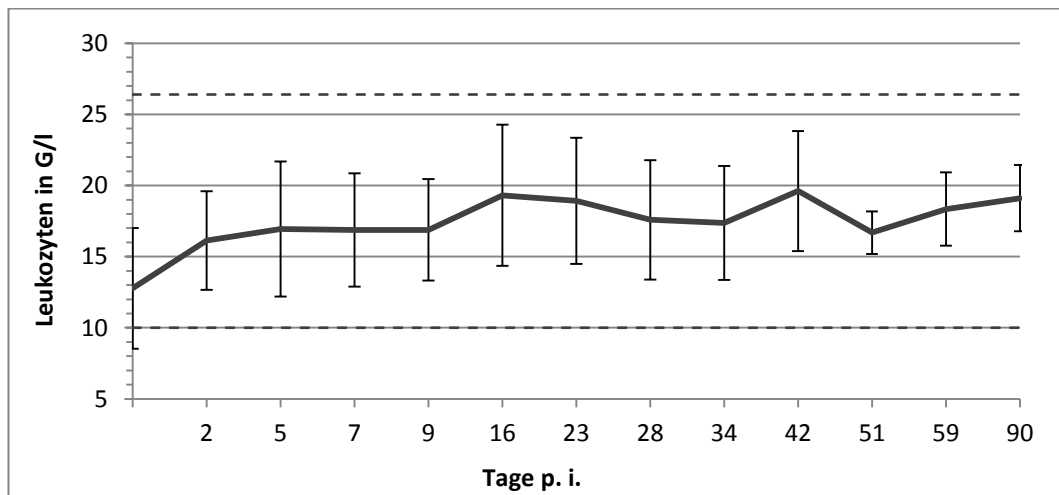


Abbildung 15: Verlauf und Standardabweichungen der mittleren Leukozytenzahl im Blut der splenektomierten, oral infizierten Tiere. Die gestrichelten Linien markieren den Referenzbereich nach NERBAS (2008)

4. Verlauf der klinisch-chemischen Parameter

4.1. Splenektomierte, subkutan infizierte Tiere

Ab Tag 7 p.i. konnte bei einzelnen Tieren makroskopisch eine gelbliche Verfärbung des Blutserums beobachtet werden.

Wie in Abbildung 16 ersichtlich kam es jeweils zum Zeitpunkt einer klinisch festgestellten akuten IAP zu einer gering- bis hochgradigen Hyperbilirubinämie mit Werten zwischen 3,25 $\mu\text{mol/l}$ und 160,2 $\mu\text{mol/l}$. Die Referenzwerte für Absetzferkel liegen für das Gesamtbilirubin bei 0 - 2,39 $\mu\text{mol/l}$ (NERBAS, 2008). Die höchsten Bilirubinwerte wurden mit 52,63 $\mu\text{mol/l}$ und 160,2 $\mu\text{mol/l}$ bei den im 2. Anfall euthanasierten Tieren (Tier 73 und 74) gemessen.

Zusätzlich wurde der Anteil an direktem (konjugiertem, sekundärem) und indirektem (unkonjugiertem, primärem) Bilirubin am Gesamtbilirubin bestimmt bzw. errechnet. In Tabelle 3 ist der jeweilige Anteil in Prozent zum Zeitpunkt der maximalen Bilirubinkonzentration im Blut der einzelnen Tiere dargestellt. Bei vier Tieren (Tier 31, 32, 74 und 76) überwog der Anteil des direkten Bilirubins am Gesamtbilirubin. Der höchste Anteil an direktem Bilirubin konnte mit einem Anteil von 82,54 % bei Tier 74 festgestellt werden. Bei drei Tieren (Tier 23, 71 und 73) ergab sich ein höherer prozentualer Anteil an indirektem Bilirubin.

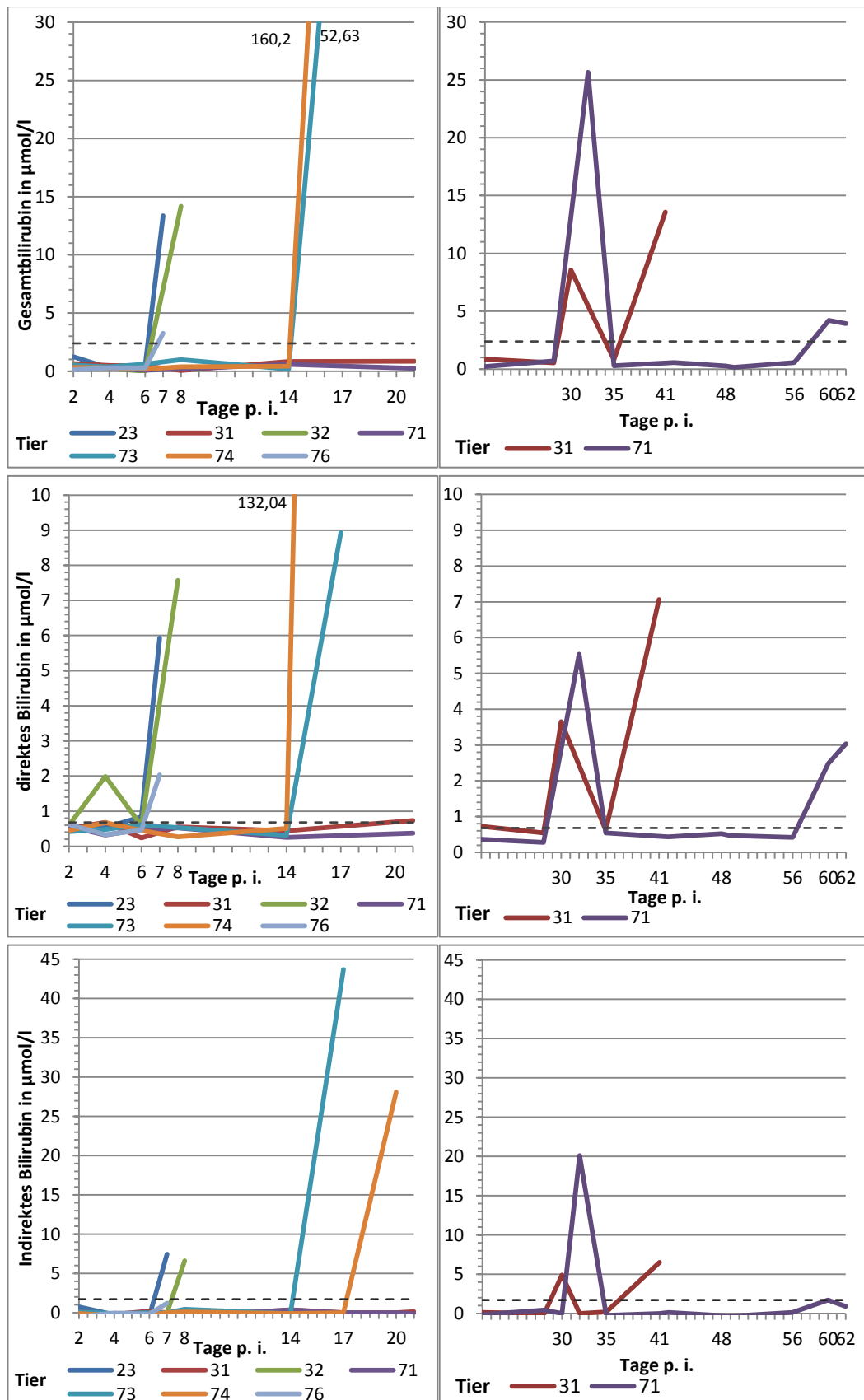


Abbildung 16: Verlaufskurven der klinisch-chemischen Blutparameter Gesamtbilirubin, direktes Bilirubin und indirektes Bilirubin über den Untersuchungszeitraum. Die gestrichelten Linien markieren die

Referenzbereiche nach NERBAS (2008)**Tabelle 3: Prozentualer Anteil des direkten und indirekten Bilirubins am Gesamtbilirubin zum Zeitpunkt der höchsten Bilirubinkonzentration im Blut je Tier**

Tier	Tag p. i.	Gesamt Bilirubin (µmol/l)	Direktes Bilirubin (µmol/l)	Indirektes Bilirubin (µmol/l)	Anteil direktes Bilirubin (%)	Anteil indirektes Bilirubin (%)
23	7	13,37	5,93	7,44	44,35	55,65
31	41	13,58	7,06	6,52	51,99	48,01
32	8	14,18	7,57	6,61	53,39	46,61
71	32	25,65	5,54	20,11	21,6	78,40
73	17	52,63	8,93	43,7	16,97	83,03
74	20	160,12	132,04	28,08	82,46	17,54
76	7	3,25	2,03	1,22	62,46	37,54

Die Blutglukosekonzentration lag bis zum Tag 6 p.i. bei allen Tieren innerhalb des Referenzbereiches von 3,93 bis 7,35 mmol/l (NERBAS, 2008). An Tag 7 und 8 p. i. konnte bei drei Tieren (Tier 23, 32 und 76) eine hochgradige Hypoglykämie festgestellt werden. Bei Tier 23 betrug die Blutglukosekonzentration zu diesem Zeitpunkt 2,1 mmol/l, bei Tier 76 1,5 mmol/l. Der niedrigste gemessene Wert betrug an Tag 8 p. i. 0,2 mmol/l bei Tier 32 (Abb. 17). Bei den Tieren 73 und 71 sank die Glukosekonzentration im Blut jeweils zum Zeitpunkt einer akuten IAP auf Werte unterhalb des Referenzbereiches ab. Der niedrigste bei Tier 71 gemessene Wert war 2,4 mmol/l an Tag 32 p.i. Die Blutglukosekonzentration im Blut der Tiere 31 und 74 verblieb im Referenzbereich.

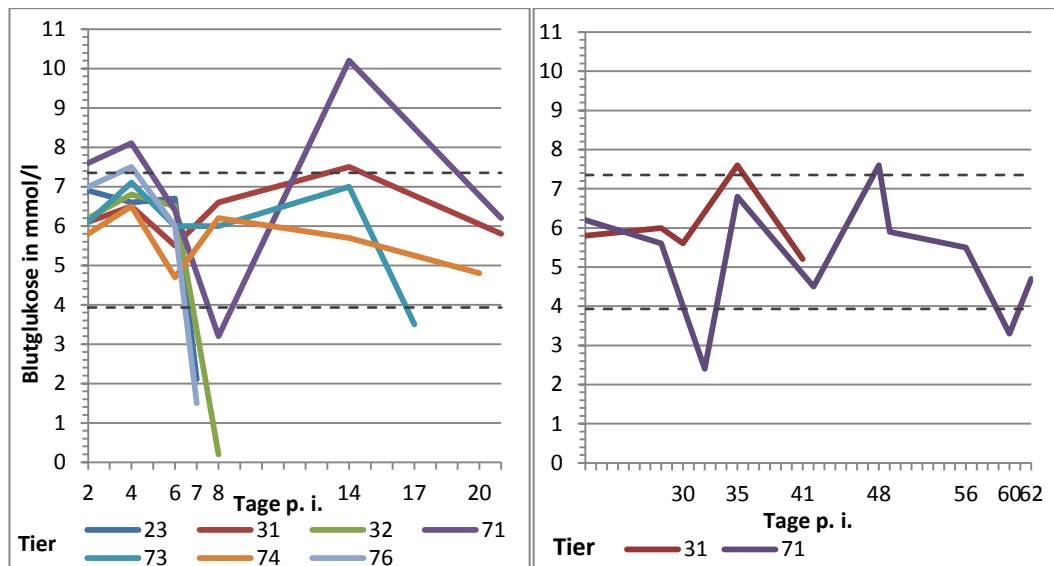


Abbildung 17: Verlaufskurve der Blutglukosekonzentration der Gruppe I über den Untersuchungszeitraum. Die gestrichelten Linien markieren den Referenzbereich nach NERBAS (2008)

Die Harnstoffkonzentration im Blut stieg bei fünf Tieren (Tier 32, 71, 73, 74 und 76) jeweils zum Zeitpunkt einer klinisch festgestellten akuten IAP über den Normbereich von 0,67 bis 5,68 mmol/l an (NERBAS, 2008). Der Maximalwert wurde an Tag 20 p. i. mit 28,4 mmol/l bei Tier 74 gemessen (Abb. 18).

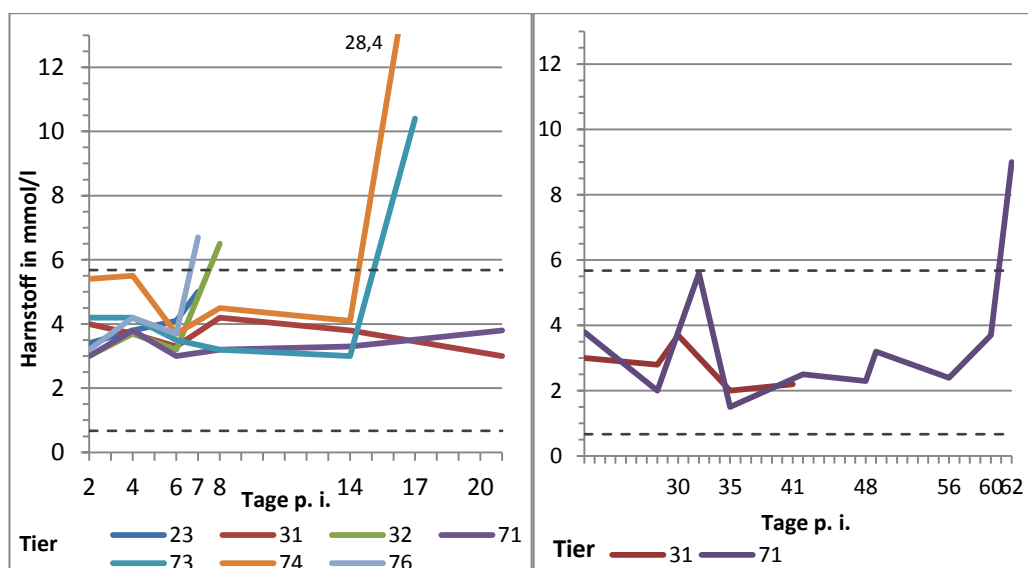


Abbildung 18: Verlaufskurven der Harnstoffkonzentration der Gruppe I über den Untersuchungszeitraum. Die gestrichelten Linien markieren den Referenzbereich nach NERBAS (2008)

Bei fünf der sieben Tiere (Tier 23, 32, 71, 73 und 76) fiel die Serumeisenkonzentration während der akuten IAP auf Werte teilweise deutlich unterhalb des Referenzbereiches von 6,3 bis 46,8 $\mu\text{mol/l}$ ((NERBAS, 2008) ab. Der niedrigste Wert lag bei 3,16 $\mu\text{mol/l}$ und wurde an Tag 62 p. i. bei Tier 71 gemessen (Abb. 19).

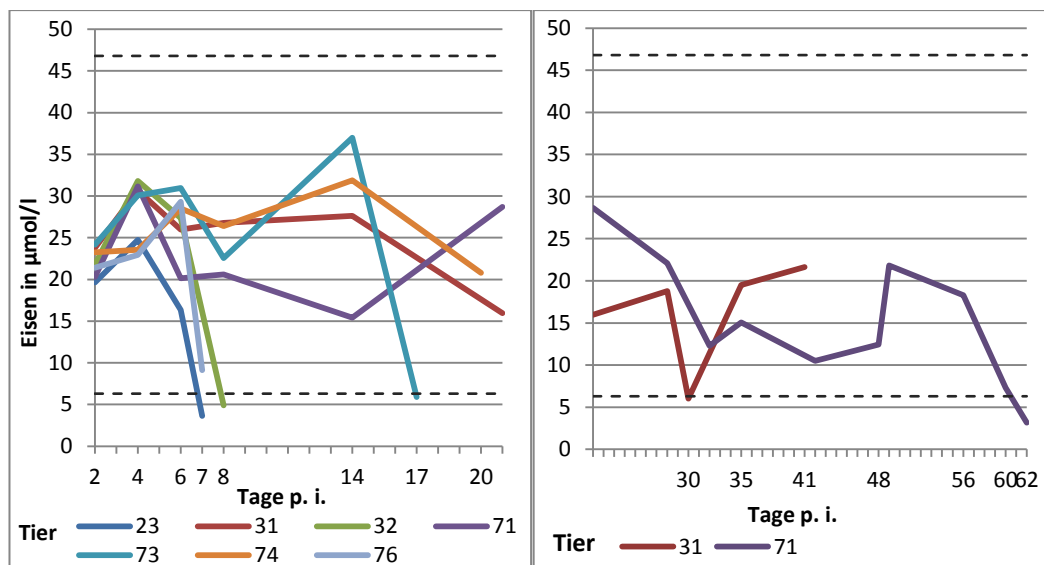


Abbildung 19: Verlaufskurven der Eisenkonzentration der Gruppe I über den Untersuchungszeitraum. Die gestrichelten Linien markieren den Referenzbereich nach NERBAS (2008)

Es erfolgte die Bestimmung der Enzyme γ -GT (Gamma-Glutamyl-Transferase), AP (Alkalische Phosphatase), AST (Aspartat-Amino-Transferase) und CK (Kreatinkinase) im Serum (Abb. 20 und 21). Die gemessenen Werte der γ -GT lagen bei den sieben Tieren aus Gruppe I zu allen Beprobungszeitpunkten oberhalb des von NERBAS (2008) ermittelten Referenzbereiches von 9,8 bis 28 U/l. Der niedrigste Wert wurde bei Tier 76 an Tag 7 p. i. gemessen und betrug 28,8 U/l. Den Maximalwert mit 68,7 U/l erreichte Tier 74 an Tag 8 p. i.

Die Verlaufskurven der AP blieben dagegen bei fünf der sieben Tiere konstant im Referenzbereich von 187 bis 579 U/l. Bei Tier 73 konnte an den Tagen 4 und 6 p. i. mit 631 bzw. 606 U/l eine leicht erhöhte Enzymaktivität nachgewiesen werden. Der höchste gemessene Wert von 786 U/l konnte an Tag 20 p. i. bei Tier 74 festgestellt werden.

Der höchste gemessene Wert für die AST lag bei 1007,8 U/l und wurde an Tag 20

p. i. bei Tier 74 gemessen. Der Maximalwert für die CK war 16118 U/l an Tag 41 p. i. bei Tier 31. Der jeweils für den Zeitpunkt der maximalen AST-Aktivität im Serum errechnete CK/AST-Quotient lag bei Werten zwischen 1,65 (Tier 31) und 282,29 (Tier 74) (Tabelle 4).

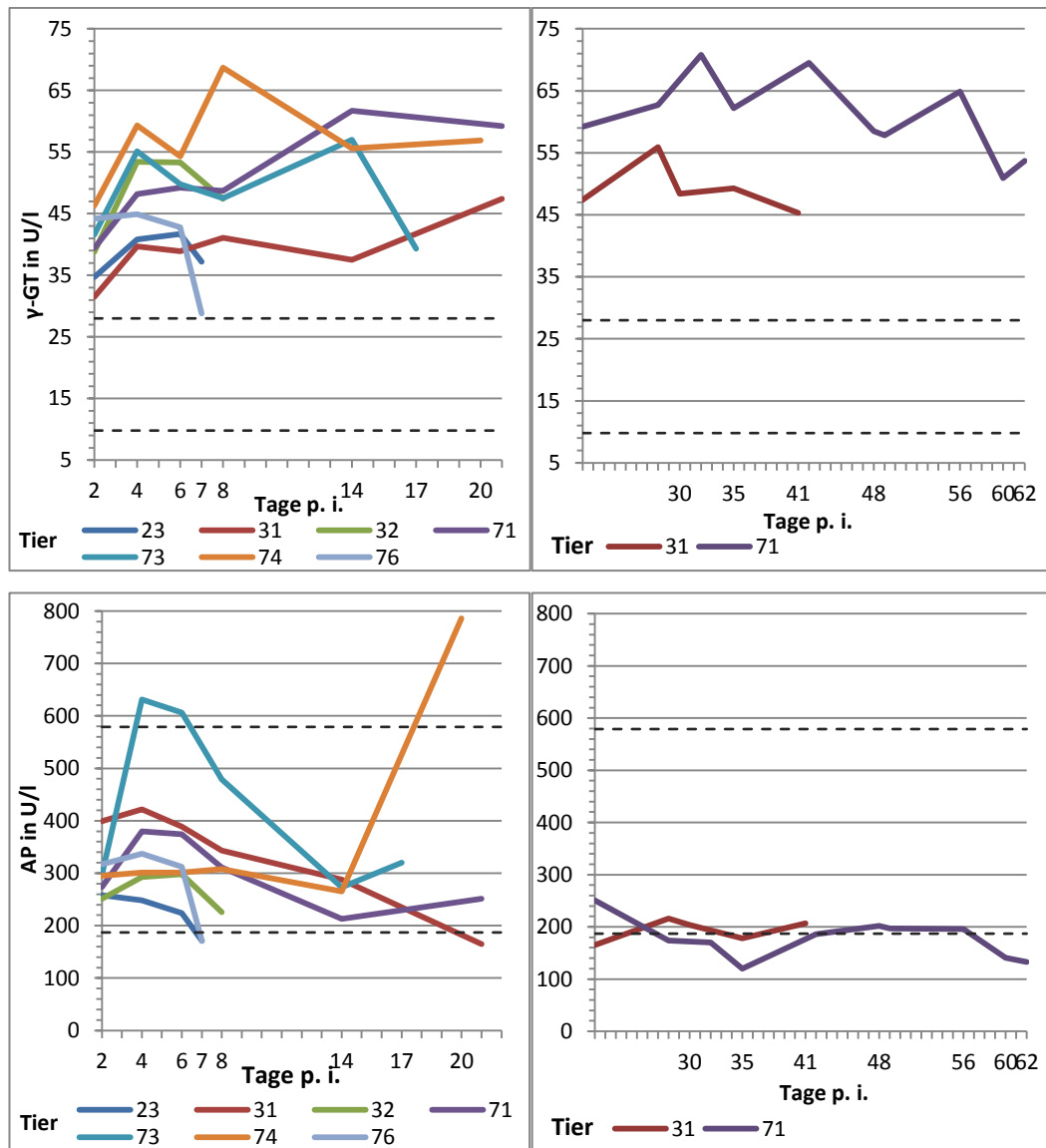


Abbildung 20: Verlauf der Enzyme γ -GT und AP der Gruppe I. Die gestrichelten Linien markieren die Referenzbereiche nach NERBAS (2008).

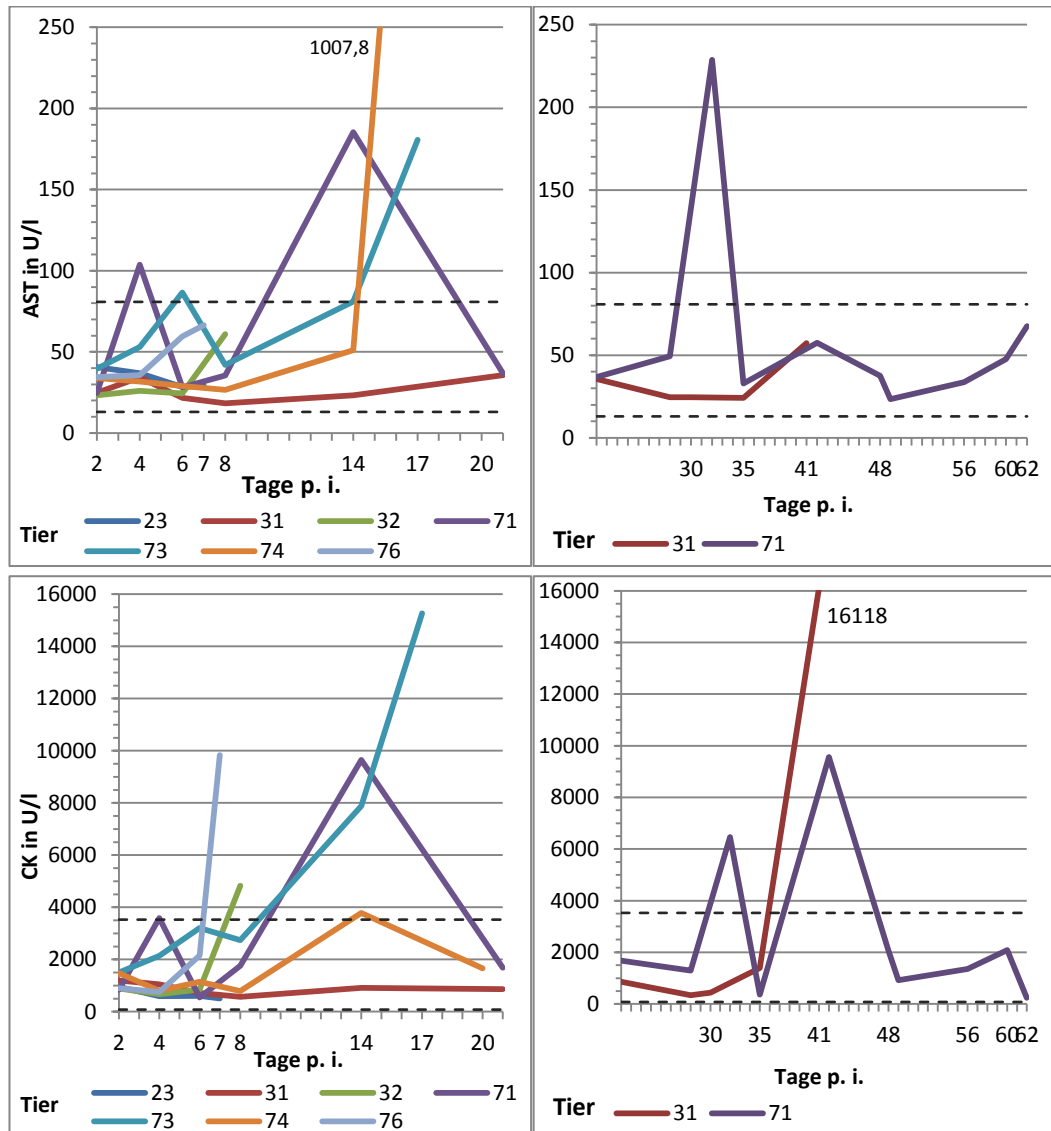


Abbildung 21: Verlauf der Enzyme AST und CK der Gruppe I. Die gestrichelten Linien markieren die Referenzbereiche nach NERBAS (2008)

Tabelle 4: Darstellung des CK/AST-Quotienten der Gruppe I zum Zeitpunkt der jeweils maximalen AST-Konzentration im Serum

Tier	Tag p. i.	CK in U/l	AST in U/l	CK/AST-Quotient
23	2	944	40,6	23,25
31	41	16118	57,3	281,29
32	8	4827	61	79,13
71	32	6464	228,7	28,26
73	17	15265	180,7	84,48
74	20	1664	1007,8	1,65
76	7	9826	66,4	148,9

4.2. Splenektomierte, oral infizierte Tiere

Die Konzentration des Gesamtbilirubins betrug bei den Tieren der Gruppe II über den Versuchszeitraum im Mittel zwischen 0,3 $\mu\text{mol/l}$ und 0,74 $\mu\text{mol/l}$ und verblieb somit im Referenzbereich von $< 2,39 \mu\text{mol/l}$ für Absetzferkel bis zum 84. LT und $< 1,84 \mu\text{mol/l}$ für Tiere ab dem 100. LT (NERBAS, 2008). Die Mittelwerte des direkten Bilirubins lagen ebenfalls innerhalb des Referenzbereiches von $< 0,68 \mu\text{mol/l}$ (NERBAS, 2008). Da zu keinem Untersuchungszeitpunkt eine Hyperbilirubinämie vorlag, wurde auf die Berechnung des indirekten Bilirubins verzichtet (Abb. 22).

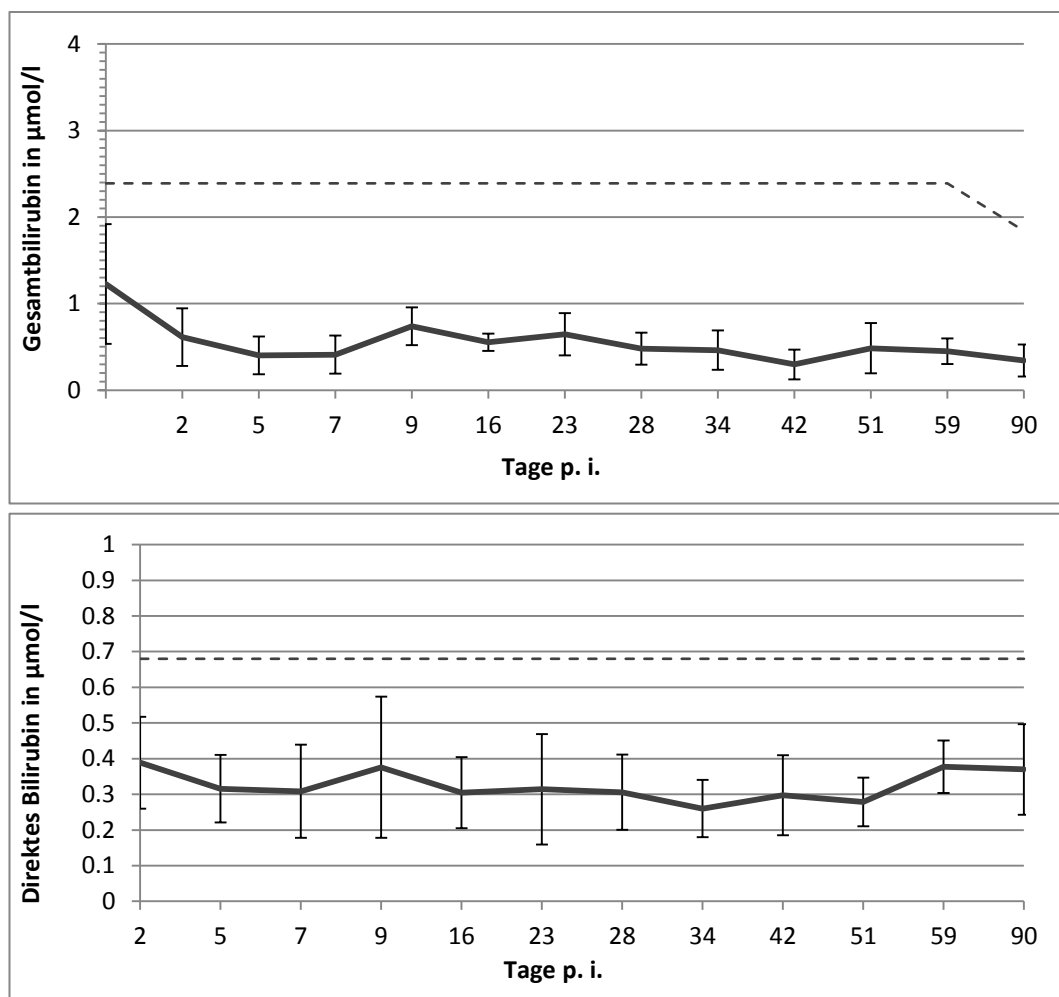
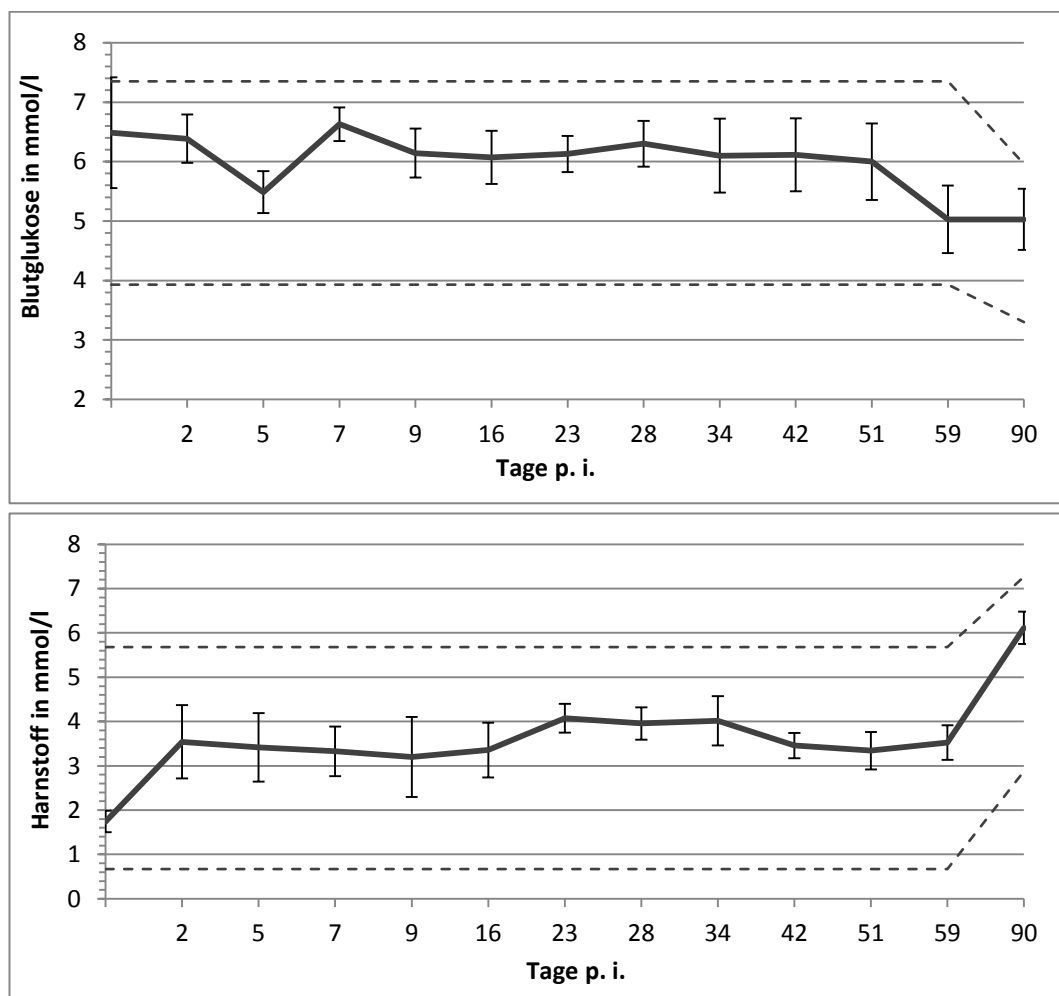


Abbildung 22: Mittelwerte und Standardabweichungen der klinisch-chemischen Parameter Gesamtbilirubin und direktes Bilirubin der Gruppe II im Versuchszeitraum von 90 Tagen. Die gestrichelten Linien markieren die Referenzbereiche nach NERBAS (2008)

Die Blutglukosekonzentration lag im Mittel bei Werten zwischen 5,03 mmol/l und 6,63 mmol/l und somit innerhalb des Referenzbereiches nach NERBAS (2008). Dieser beträgt bei Tieren bis zum 84. LT 3,93 – 7,35 mmol/l und bei Tieren ab dem 100. LT 3,30 – 5,96 mmol/l.

Der Referenzbereich für die Harnstoffkonzentration liegt bei 0,67 bis 5,68 mmol/l für Tiere bis zum 84. LT und bei 2,88 bis 7,27 mmol/l für Tiere ab dem 100. LT (NERBAS, 2008). Der Mittelwert der Harnstoffkonzentration verblieb bei den Tieren der Gruppe II über den gesamten Versuchszeitraum von 90 Tagen innerhalb des oben genannten Referenzbereiches.

Die mittlere Serumeisenkonzentration blieb bei den Tieren der Gruppe II über den Versuchszeitraum im Referenzbereich nach NERBAS (2008). Dieser beträgt bei Tieren bis zum 84. LT 6,3 bis 46,8 $\mu\text{mol/l}$ und bei Tieren ab dem 100. LT 9,2 bis 40,5 $\mu\text{mol/l}$ (Abb. 23).



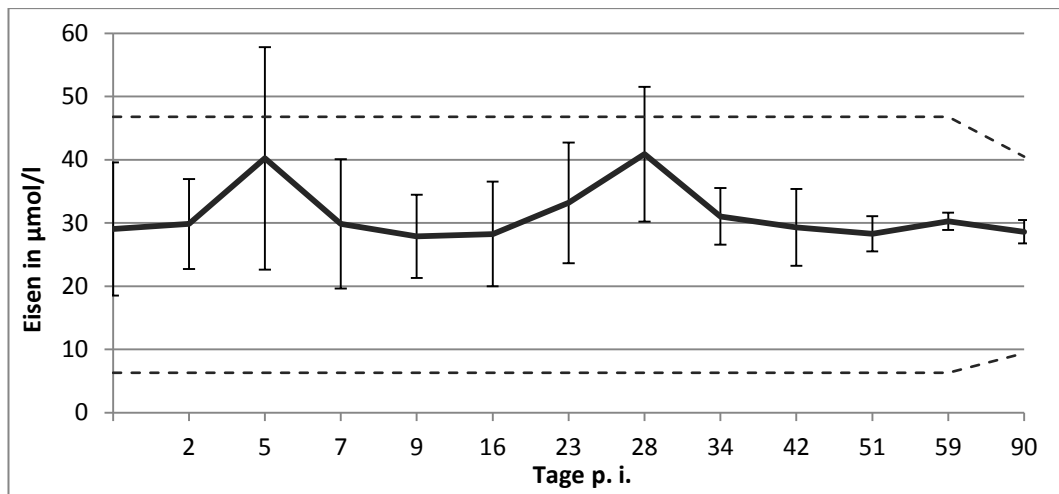


Abbildung 23: Mittelwerte und Standardabweichungen der klinisch-chemischen Parameter Blutglukose, Harnstoff und Eisen der Gruppe II im Versuchszeitraum von 90 Tagen. Die gestrichelten Linien markieren die Referenzbereiche nach NERBAS (2008)

Auch bei den Tieren der Gruppe II wurden die Enzymaktivitäten der γ -GT, AP, AST und CK im Serum bestimmt. Mit Ausnahme der γ -GT verliefen die Mittelwerte innerhalb der von NERBAS (2008) bestimmten Referenzbereiche. Die γ -GT zeigte über den gesamten Untersuchungszeitraum eine erhöhte Enzymaktivität (Abb. 24).

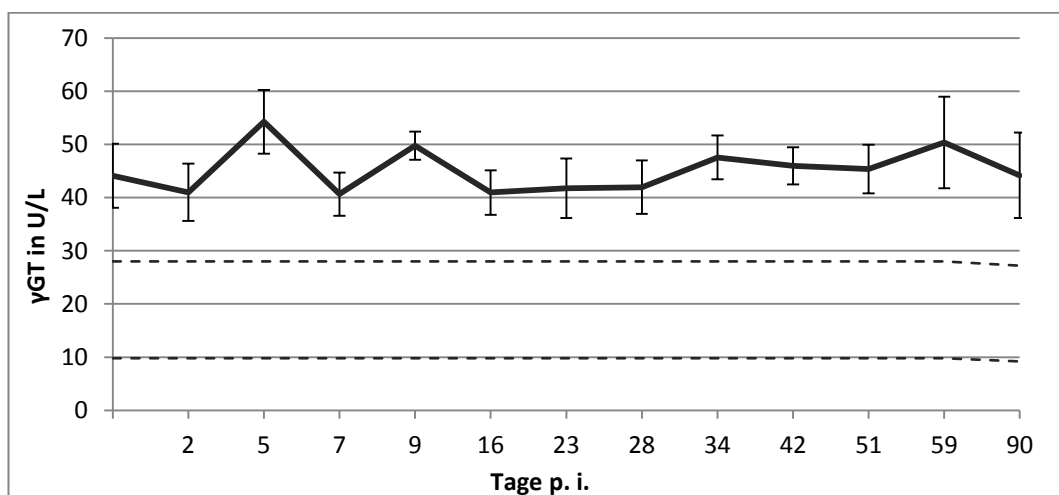


Abbildung 24: Verlaufskurve der Mittelwerte und Standardabweichungen des Enzyms γ -GT (Gamma-Glutamyl-Transferase) im Serum der Gruppe II über den Versuchszeitraum von 90 Tagen. Die gestrichelten Linien markieren den Referenzbereich nach NERBAS (2008)

5. Pathologisch-anatomische Untersuchung

Die pathologisch-anatomische Untersuchung wurde bei den Tieren der Gruppe I (subkutan infiziert) nach Euthanasie bzw. Verenden durchgeführt.

In der pathologisch-anatomischen Untersuchung zeigte sich bei zwei von sieben Tieren (Tier 73 und 74) ein hochgradiger Ikterus mit Gelbfärbung von Haut und Schleimhäuten (Abb. 25). Bei Tier 74 fand sich zusätzlich eine Ansammlung wässrig-durchscheinender, ikterisch verfärbter Flüssigkeit in der Bauchhöhle (Aszites) (Abb. 26). Tier 73 und 71 zeigten Anzeichen einer Anämie wie etwa eine blasse Muskulatur.

Die Intestinal- bzw. die Mediastinallymphknoten von zwei der sieben Tiere (Tier 71 und 73) waren hochgradig geschwollen und durch Blutresorption gerötet.

Die Leber war bei der makroskopischen Untersuchung bei Tier 76 aufgehellet, bei Tier 32 generalisiert fleckig und bei Tier 71 hyperämisch. Bei Tier 73 fanden sich einzelne miliare gelblich weiße Herde (Abb. 27), bei Tier 74 unregelmäßig verteilte, beige, nicht erhabene Herde mit einem Durchmesser von bis zu 5 mm (Abb. 28). Bei den Tieren 74 und 71 wurde zusätzlich ein mittel- bis hochgradiges Gallenblasenbettödem festgestellt (Abb. 29).

Bei drei von sieben Tieren (Tier 23, 76 und 32) konnte eine Hyperämie der Lunge sowie ein Lungenödem und –emphysem festgestellt werden. Eine geringgradige Verdichtung der ventralen Anteile des rechten kranialen Lungenlappens trat bei Tier 74 auf, die Lunge von Tier 31 stellte sich subpleural rötlich-fleckig gefärbt dar.

Die Nieren von vier der sieben Tiere (Tier 32, 73, 74 und 31) zeigten multiple unscharf begrenzte, weiße, nicht erhabene Herde mit einem Durchmesser von 1 bis 5 mm mit variablem Verteilungsmuster. Während die Nieren von Tier 32 insgesamt mit Herden durchsetzt waren, fanden diese sich bei Tier 31 nur in der Nierenrinde. Bei Tier 76 waren die Nieren generalisiert aufgehellet, bei Tier 71 hyperämisch.

Bei fünf von sieben Tieren (Tier 23, 76, 73, 74 und 31) fand sich im Magen eine Hyperkeratose der *Pars proventricularis*. Bei Tier 74 zeigten sich zusätzlich multiple miliare Erosionen ebenfalls in der *Pars proventricularis*, bei Tier 76 Ulzerationen in der *Pars proventricularis* und ein 4 x 1 cm großes Ulkus im Pylorusbereich.

Die pathologisch-anatomische Untersuchung von Herz und Gefäßen, Klein- und Großhirn, Intestinaltrakt mit Pankreas sowie der inneren und äußeren Geschlechtsorgane verlief bei allen sieben Tieren ohne besonderen Befund.



Abbildung 25: Gelbfärbung der Gefäßwand der Aorta bei Tier 74

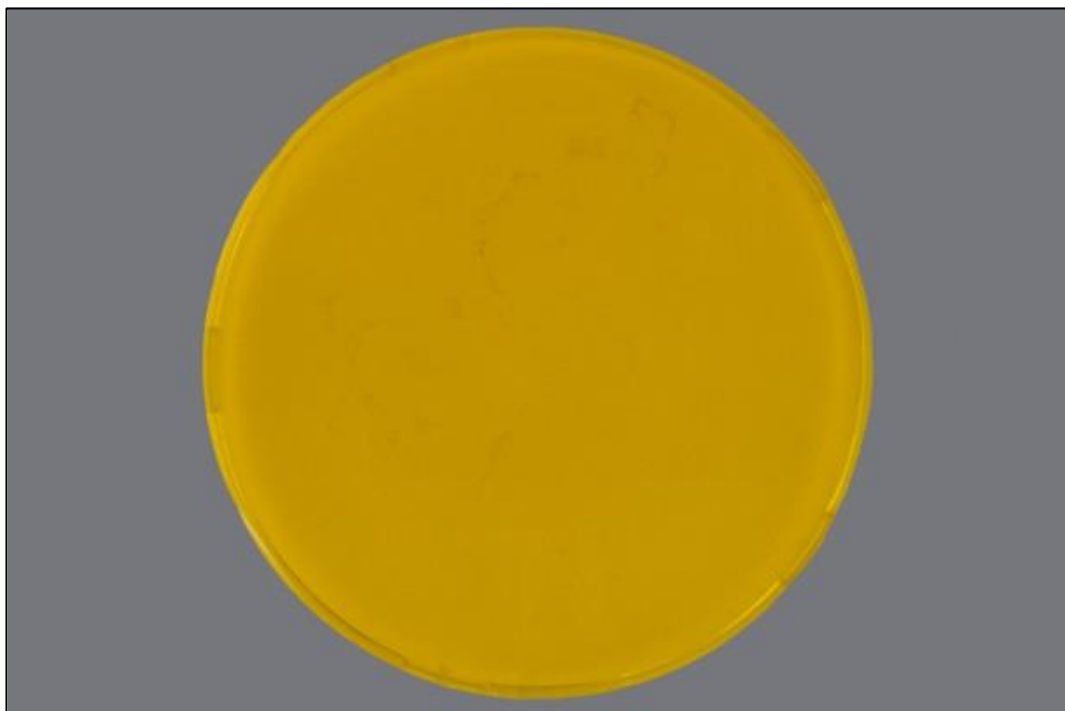


Abbildung 26: Wässrig-durchscheinende, ikterisch verfärbte Flüssigkeit aus der Bauchhöhle von Tier 74



Abbildung 27: Landkartenartige gelbliche Herde in der Leber von Tier 73



Abbildung 28: Ungleichmäßig verteilte, beige Herde und Ikterus in der Leber

von Tier 74

Abbildung 29: Hochgradiges Gallenblasenbettödem und Ikterus bei Tier 74

6. Histopathologische Untersuchung

In der histopathologischen Untersuchung der Leber zeigten drei der sieben Tiere (Tier 23, 71 und 76) eine geringgradige unspezifische reaktive interstitielle Hepatitis unter Beteiligung von Lymphozyten, Plasmazellen, eosinophilen und basophilen Granulozyten sowie Makrophagen (Abb. 31A). Bei Tier 73 zeigten sich zentrolobuläre Leberzellnekrosen sowie eine geringgradige kleintropfige Verfettung der intakten Hepatozyten. In der Leber von Tier 74 konnten peripherlobuläre Leberzellnekrosen und Einblutungen sowie eine Verfettung der intakten Hepatozyten festgestellt werden. Es zeigte sich außerdem eine hochgradige Kompression der Sinusoide (Abb. 30). Bei vier Tieren (Tier 73, 74, 31 und 71) wurde eine multifokale Erythrophagozytose durch Kupffer-Zellen festgestellt, bei zwei Tieren (Tier 23 und 32) fand sich in den Makrophagen das Pigment Hämosiderin, ein Abbauprodukt des Hämoglobins (Abb. 31B). Bei drei Tieren (Tier 23, 74 und 71) bestand ein gering- bis hochgradiges Gallenblasenbettödem. Auffällig waren die bei vier Tieren (Tier 71, 73, 74 und 76) als Gerinnungsprodukt

auftretenden hyalinen Kügelchen in Sinusoiden und Gefäßen der Leber (Abb. 31C), sowie die hochgradige Dilatation der Lymphgefäße sowohl in Portalfeldern als auch im bindegewebigen Gallenblasenbett bei vier Tieren (Tier 31, 32, 73 und 74) (Abb. 31D und 33A/B).

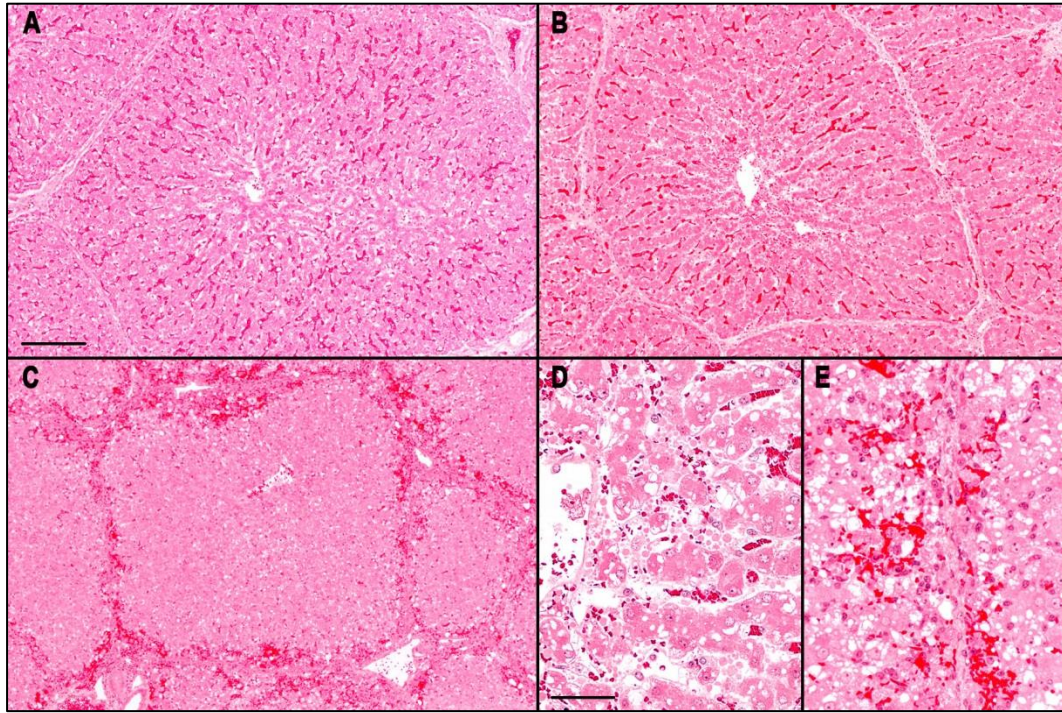


Abbildung 30: Veränderungen der Leber bei experimentell mit *M. suis* infizierten Schweinen.

Übersichten über Leberläppchen bei verschiedenen Läppchen-bezogenen Veränderungen.

A. Weitgehend unverändertes Leberläppchen, die Portalfelder sind teilweise angeschnitten, die zentripetal verlaufenden Leberzellbalken und Sinusoide sind deutlich zu erkennen, ebenso wie die Zentralvene.

B. Leberläppchen mit zentrolobulären Leberzellnekrosen, das Bälkchenmuster ist gut zu erkennen.

C. Leberläppchen mit peripherlobulärer Leberzellnekrose und Einblutungen, der Verlauf der Leberzellbalken und Sinusoide ist nicht mehr zu erkennen, eindeutige Hinweise auf eine panlobuläre Leberzellnekrose fanden sich nicht.

D. Ausschnitt aus B, zu erkennen ist die Nekrose von Hepatozyten, die unmittelbar an die Zentralvene grenzen, in den intakten Hepatozyten findet sich eine geringgradige kleintropfige Verfettung.

E. Ausschnitt aus C, zeigt den Untergang von Hepatozyten in der Peripherie zweier Leberläppchen, die an ein interlobuläres Septum grenzen, sowie die gleichzeitige Einblutung in diesem Bereich, die noch intakten Hepatozyten weisen eine Verfettung auf.

Kunststoffeinbettung, HE-Färbung, Maßstab für A -C = 200 µm, für D und E = 50

µm; A Tier 31, B und D Tier 73, C und E Tier 74

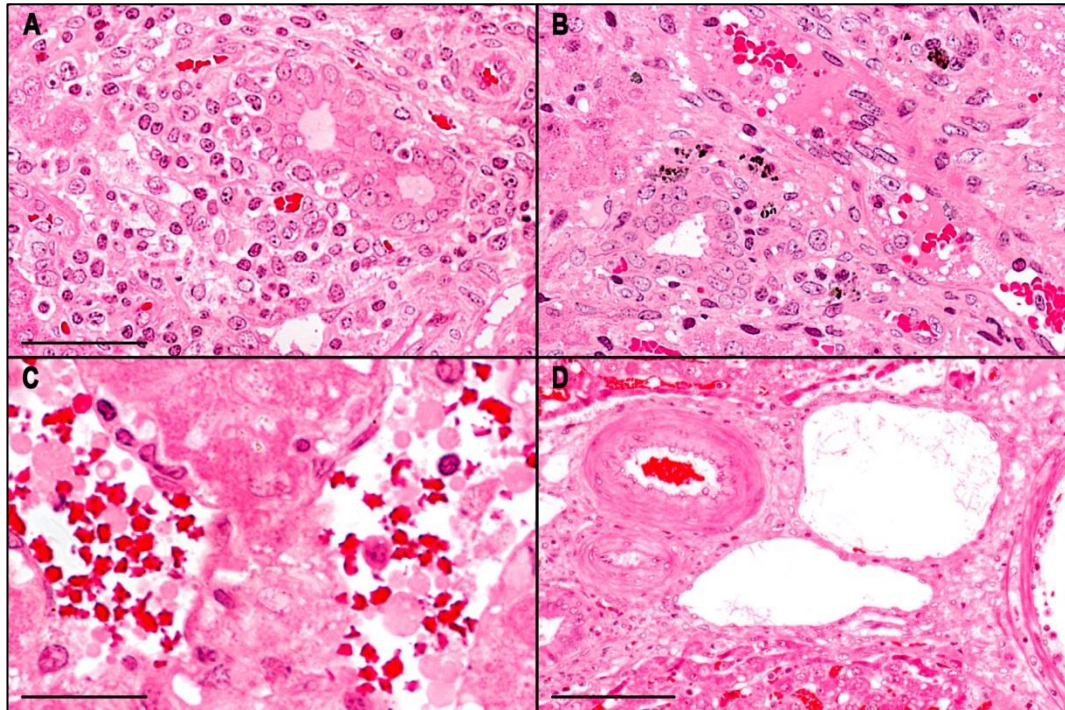


Abbildung 31: Veränderungen der Leber bei experimentell mit *M. suis* infizierten Schweinen.

A. Infiltration eines Portalfeldes mit überwiegend Lymphozyten und einzelnen Plasmazellen, sehr wahrscheinlich im Sinne einer unspezifischen, reaktiven Hepatitis.

B. Pigmenthaltige Makrophagen in einem Portalfeld, bei dem Pigment handelt es sich um Hämosiderin, ein Abbauprodukt des Hämoglobins.

C. Hyaline Kügelchen als atypische Gerinnungsprodukte in zwei Anschnitten einer Zentralvene; die deutlich rosa gefärbten Gebilde sind deutlich größer als Erythrozyten.

D. Dilatierte Lymphgefäße im Glissonschen Dreieck.

Kunststoffeinbettung, HE-Färbung, Maßstab für A und D = 50 µm, für c = 25 µm und D = 100 µm; A und B Tier 23, C Tier 74 und D Tier 31

Bei vier der sieben Tiere (Tier 31, 73, 74 und 76) bestätigte sich histologisch das bereits in der pathologisch-anatomischen Untersuchung festgestellte mittelgradige alveoläre und interstitielle Lungenödem mit einer Dilatation der Lymphgefäße (Abb. 33C). Ansonsten dominierten bei der Untersuchung der Lungen der sieben Tiere die Hinweise auf Störungen der Blutgerinnung. Bei Tier 71 fanden sich ein frischer Gefäßthrombus sowie hyaline Kügelchen in den alveolären Kapillaren (Abb. 32A). In den hochgradig dilatierten alveolären Kapillaren von Tier 76 fanden sich sowohl fibrinarme als auch fibrinhaltige Gerinnsel (Abb. 32B/C). Auch in den

kleinen Lungengefäßen von Tier 31 und 32 konnten Fibringerinnsel dargestellt werden (Abb. 32D). Die Verdichtung der ventralen Anteile des rechten kranialen Lungenlappens bei Tier 74 stellte sich histologisch als lobäre, mittelgradige interstitielle und katarrhalisch-eitrige Bronchopneumonie dar.

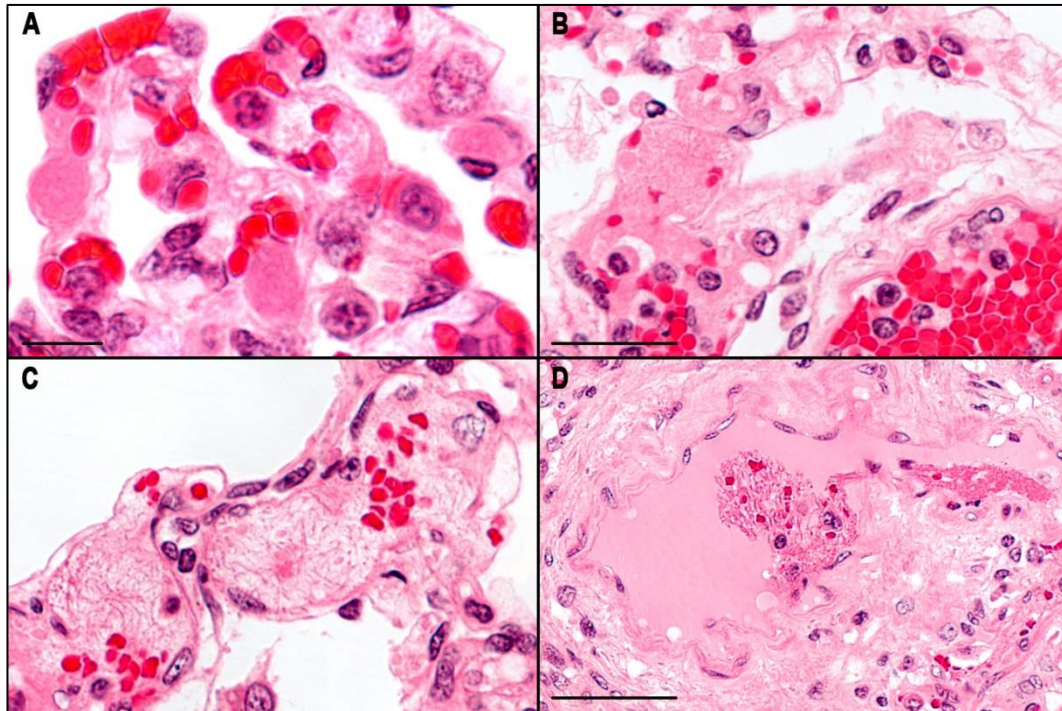


Abbildung 32: Veränderungen der Lunge bei experimentell mit *M. suis* infizierten Schweinen.

Bei den Lungen der untersuchten Tiere dominierten die Hinweise auf Störungen der Blutgerinnung.

- A. Hyaline Kügelchen, wahrscheinlich Emboli, in alveolären Kapillaren.
- B. Fibrinarmes Gerinnsel in einer hochgradig dilatierten alveolären Kapillare.
- C. Fibringerinnsel in einer hochgradig dilatierten alveolären Kapillare bei dem gleichen Tier wie in B.
- D. Wandständiges Fibringerinnsel in einer Arteriole oder kleinen Arterie.

Kunststoffeinbettung, HE-Färbung, Maßstab für A = 10 µm, für B und C = 25 µm und D = 50 µm; A Tier 71, B und C Tier 76 und D Tier 31

In der histopathologischen Untersuchung der Nieren zeigte sich bei Tier 32 eine chronische Entzündung im Bindegewebe des Nierenbeckens, bei Tier 31 eine nichteitrig interstitielle Nephritis mit einer Dilatation der Lymphgefäße (Abb. 33D).

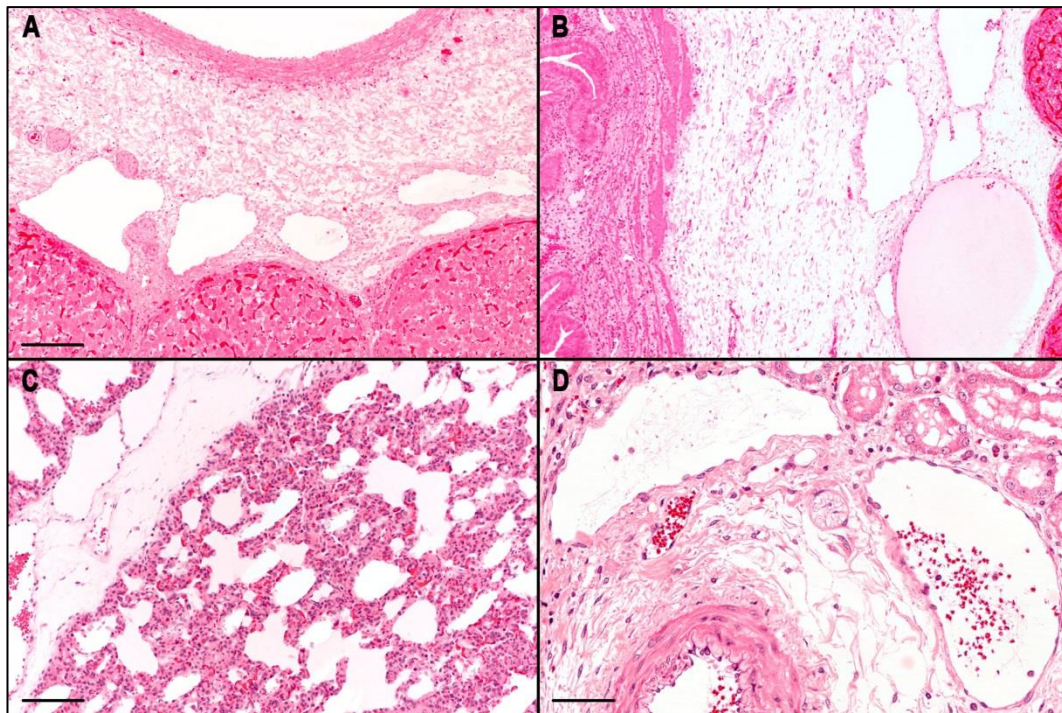


Abbildung 33: Veränderungen an den Lymphgefäßen bei experimentell mit *M. suis* infizierten Schweinen.

In den untersuchten Organen fanden sich vielfach dilatierte Lymphgefäße als Hinweis auf eine Permeabilitätsstörung mit Bildung eines interstitiellen Ödems oder eines alveolären Lungenödems.

A. Dilatierte Lymphgefäße in einem Portalfeld der Leber.

B. Dilatierte Lymphgefäße im bindegewebigen Lager der Gallenblase.

C. Ein dilatiertes septales Lymphgefäß bei einem alveolären Lungenödem.

D. Dilatierte Lymphgefäße im Interstitium der Niere.

Kunststoffeinbettung, HE-Färbung, Maßstab für A und B = 200 μm , für C = 100 μm und für D = 50 μm ; A Tier 73, B Tier 32, C Tier 74 und D Tier 31

In den geschwollenen Lymphknoten von Tier 73 und 71 fanden sich auch histologisch Anzeichen einer Blutresorption. Bei sechs von sieben Tieren (Tier 76, 32, 73, 74, 31 und 71) zeigten sich multifokal eine gesteigerte Erythrophagozytose sowie das Auftreten von Siderophagen. Die Inguinallymphknoten von Tier 31 zeigten eine follikuläre Hyperplasie, die Mesenteriallymphknoten von Tier 23 eine Sinushistiozytose. Bei zwei Tieren (Tier 74 und 31) fand sich Fibrin im Sinus verschiedener Lymphknoten.

Bei Tier 73 fanden sich in den mittelgroßen Gefäßen diverser Organe multifokal Fibrinnetze. Ebenfalls bei diesem Tier ließ sich in der *V. cava* ein fokaler

Endothelzellverlust mit Thrombusbildung, muraler Fibrininsudation, gemischtzelligen Infiltraten und einer akuten Blutung feststellen. In der Aorta von Tier 32 zeigte sich an einer Lokalisation eine ausgeprägte zirkuläre Fibrinexsudation mit begleitender Infiltration von Makrophagen und Lymphozyten.

Es wurde Knochenmark von Femur und Sternum gewonnen und histopathologisch untersucht. Es zeigte sich ein weitgehend unverändertes hämatopoetisch aktives Markgewebe mit dominierender Erythrozytopoese (Abb. 34A). Bei drei Tieren (Tier 23, 31 und 71) zeigte sich Erythrophagozytose durch Makrophagen (Abb. 34B-E).

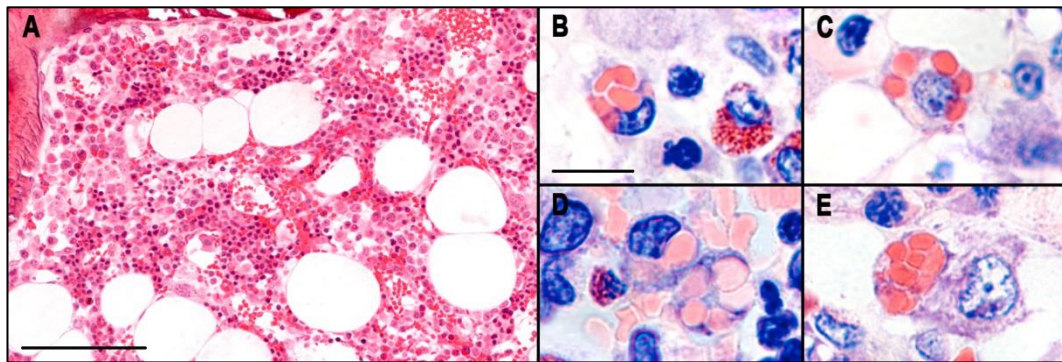


Abbildung 34: Veränderungen des Knochenmarks bei experimentell mit *M. suis* infizierten Schweinen.

A. Die Übersicht zeigt ein weitgehend unverändertes hämatopoetisch aktives Markgewebe, wobei die Erythrozytopoese dominiert.

B bis E. Erythrophagozytose durch Makrophagen.

Kunststoffeinbettung, A: HE, Färbung, Maßstab = 50 µm, Tier 74; B bis E Giemsa-Färbung, Maßstab = 10 µm; B und C Tier 71, D und E Tier 31

In der Großhirnrinde von Tier 23 zeigten sich multifokal viele eosinophile Nervenzellnekrosen. Bei Tier 76 konnten multifokal geringgradige akute Blutungen in der Leptomeninx sowie ein Ödem festgestellt werden. Im Plexus des vierten Ventrikels des Gehirns von Tier 32 fanden sich multifokal betont perivaskulär plasmazelluläre und histiozytäre Infiltrate. Bei den restlichen vier Tieren (Tier 31, 71, 73, und 74) konnten in den Gefäßen sowie perivaskulär neutrophile Granulozyten und Monozyten festgestellt werden, bei Tier 31 parenchymatös und choroidplexal, bei Tier 71 leptomeningeal, bei Tier 73 choroidplexal und subependymal im Lateralventrikel und bei Tier 74 kortikal.

Zusätzlich fand sich bei Tier 73 eine Endothelzellschwellung und bei Tier 71 in der Leptomeninx eine perivaskuläre Infiltration mit Makrophagen, Lymphozyten sowie neutrophilen und eosinophilen Granulozyten.

Alle sieben Tiere zeigten in der histopathologischen Untersuchung eine gering-bis mittelgradige, multifokale follikuläre Gastritis sowie eine Hyperplasie des GALT (Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe) v.a. im Dick- vereinzelt aber auch im Dünndarm.

7. Nachweis von *M. suis* in Organen

Zum Nachweis von *M. suis* in verschiedenen, bei der Sektion entnommenen Organen der Tiere aus Gruppe I wurde eine quantitative PCR auf *M. suis* eingeleitet. Zusätzlich wurden nach Giemsa gefärbte Kunststoffschnitte untersucht sowie eine immunhistologische Untersuchung durchgeführt.

7.1. Ergebnisse der PCR

Es wurden von allen Tieren der Gruppe I Gewebeproben von Lunge, Leber, Niere, Gehirn, Lymphknoten und Knochenmark entnommen und mittels quantitativer PCR auf das Vorhandensein von *M. suis* untersucht. Es konnte in allen Organen und Geweben *M. suis*-DNA nachgewiesen werden. In Tabelle 5 dargestellt ist die in der quantitativen PCR ermittelte Erregermenge pro Gramm des jeweiligen Organs.

Die im Mittel höchsten Erregermengen wurden mit $1,03 \times 10^9$ *M. suis*/g in den Nieren nachgewiesen. Die mittleren Erregermengen im Gehirn, den Lymphknoten und dem Knochenmark betrugen $3,58 \times 10^8$ *M. suis*/g (Gehirn), $6,8 \times 10^8$ *M. suis*/g (Lymphknoten) und $6,2 \times 10^8$ *M. suis*/g (Knochenmark). In der Lunge konnten im Durchschnitt $1,08 \times 10^4$ *M. suis*/g nachgewiesen werden, die geringste Menge an *M. suis*-DNA wurde mit durchschnittlich $4,7 \times 10^3$ *M. suis*/g in der Leber detektiert.

Bei Tier 74 wies ausschließlich die Niere eine hohe Erregermenge ($1,09 \times 10^9$ *M. suis*/g) auf, während die Erregermengen in den anderen untersuchten Organen mit 5,96 *M. suis*/g bis $1,2 \times 10^2$ *M. suis*/g vergleichsweise niedrig waren.

Tabelle 5: Erregermenge in Lunge, Leber, Niere, Gehirn, Knochenmark und

Lymphknoten der Tiere aus Gruppe I

Tier		Lunge	Leber	Niere	Gehirn	Knochenmark	Lymphknoten
23	Quantität	8,2x10 ³	1,07x10 ⁴	2,49x10 ⁹	4,53x10 ³	2,54x10 ⁹	3,13x10 ⁹
	CT	22,38	26,14	4,31	23,23	4,28	3,98
31	Quantität	1,74x10 ⁴	1,29x10 ³	2,99x10 ⁹	7,19x10 ⁸	4,27x10 ²	3,23x10 ⁸
	CT	21,31	29,12	4,05	8,09	26,61	7,24
32	Quantität	5,71x10 ²	2,9x10 ³	8,8x10 ⁷	2,1x10 ⁵	2,99x10 ²	3,97x10 ⁷
	CT	26,2	27,99	9,1	17,74	25,87	10,23
71	Quantität	2,32x10 ⁴	2,8x10 ²	1,03x10 ⁸	1,59x10 ²	1,04x10 ⁴	2,15x10 ¹
	CT	20,89	31,28	8,87	28,02	22,05	30,89
73	Quantität	2,35x10 ⁴	1,16x10 ⁴	3,32x10 ⁸	1,56x10 ³	1,3x10 ⁵	1,77x10 ¹
	CT	20,87	26,03	7,2	24,76	18,43	31,17
74	Quantität	1,20x10 ²	7,61x10 ¹	1,09x10 ⁹	4,17x10 ¹	1,2x10 ¹	5,96
	CT	28,42	33,13	5,49	29,94	30,53	31,55
76	Quantität	2,92x10 ³	6,08x10 ³	1,43x10 ⁸	1,79x10 ⁹	1,8x10 ⁹	1,27x10 ⁹
	CT	23,86	26,94	8,41	4,78	4,78	5,28

Die Ergebnisse der *M. suis*-spezifischen PCR der zum Zeitpunkt der Euthanasie entnommenen EDTA-Blutproben und der Organproben von Leber, Lunge, Niere und Gehirn wurden in Anlehnung an TASKER und Mitarbeiter (2009) miteinander verglichen. In Tabelle 6 dargestellt ist die Erregermenge im Blut der Tiere aus Gruppe I zum Zeitpunkt der Euthanasie, die mittels PCR ermittelte Erregermenge in den Organen Leber, Lunge, Niere und Gehirn sowie die erwartete Erregermenge/g Organ unter Berücksichtigung der Erregermenge im Blut und des erwarteten Blutvolumens in den Organen. Zusätzlich wurde der Quotient aus der erwarteten und der tatsächlich ermittelten Erregermenge gebildet, um eine Einschätzung der Ergebnisse zu erlauben. Ein Quotient ≥ 5 zeigt eine deutlich höhere in der PCR ermittelte Erregermenge an als durch die Blutversorgung allein zu erwarten wäre, ein Quotient < 1 eine deutlich geringere (TASKER et al., 2009). Bei allen 7 Tieren wiesen die Nieren eine deutlich höhere Erregermenge in der PCR auf, als durch die Organdurchblutung allein zu erwarten war (Quotient > 5). Bei jeweils 2 Tieren trifft dies auch auf die Lunge (Tier 31 und 71) und auf das Gehirn (Tier 31 und 76) zu. Zusätzlich lag bei der Leber von Tier 31 die mittels PCR ermittelte Erregermenge geringfügig höher als die zu erwartende (Quotient 8,6). Tier 31 war das einzige Tier, bei dem in der quantitativen PCR in allen untersuchten Organen eine höhere Erregermenge ermittelt wurde, als durch die Durchblutung der Organe zu erwarten war.

Tabelle 6: Zusammenfassung der Erregermenge in Blut und Organen.

Erreger-menge	Tier	23	31	32	71	73	74	76
Blut	<i>M. suis</i> /ml	1,8x10 ⁷	4,60x10 ⁵	4,79x10 ⁷	2,24x10 ⁵	1,19x10 ⁷	6,33x10 ⁴	4,34x10 ⁷
Leber	<i>M. suis</i> /g erwartet ^a	6,20x10 ³	1,50x10²	1,50x10 ⁴	7,70x10 ¹	4,10x10 ³	2,20x10 ¹	1,50x10 ⁴
	<i>M. suis</i> /g PCR	1,07x10 ⁴	1,29x10³	2,90x10 ³	2,80x10 ²	1,16x10 ⁴	7,61x10 ¹	6,08x10 ³
	Quotient	1,73	8,60^b	0,193	3,64	2,83	3,45	0,41
Lunge	<i>M. suis</i> /g erwartet ^a	5,50x10 ⁴	5,55	6,10x10 ⁴	2,60	1,50x10 ⁴	7,50x10 ¹	5,50x10 ⁴
	<i>M. suis</i> /g PCR	8,20x10 ³	1,74x10⁴	5,71x10 ²	2,32x10⁴	2,35x10 ⁴	1,20x10 ²	2,92x10 ³
	Quotient	0,15	3135,16^b	0,0094	8923,08^b	1,56	1,60	0,053
Niere	<i>M. suis</i> /g erwartet ^a	1,40x10⁴	2,8x10²	3,80x10⁵	1,40x10²	7,50x10³	3,91x10²	3,40x10⁴
	<i>M. suis</i> /g PCR	2,49x10⁹	2,99x10⁹	8,80x10⁷	1,03x10⁸	3,32x10⁸	1,09x10⁹	1,43x10⁸
	Quotient	177857^b	10678571^b	231,58^b	735714^b	44266^b	2787723^b	4205,88^b
Gehirn	<i>M. suis</i> /g erwartet ^a	2,00x10 ⁴	5,00x10²	5,20x10 ⁴	2,40x10 ³	2,40x10 ⁴	1,30x10 ²	4,80x10⁴
	<i>M. suis</i> /g PCR	4,53x10 ³	7,19x10⁸	2,10x10 ⁵	1,59x10 ²	1,56x10 ³	4,17x10 ¹	1,79x10⁹
	Quotient	0,23	1438000^b	4,04	0,066	0,065	0,32	37291,66^b

^a Berechnet unter Berücksichtigung der Erregermenge im Blut zum Zeitpunkt des Todes und des erwarteten Blutvolumens in den Organen

^b Organe mit einem Quotienten >5 (höhere Erregermenge als erwartet) sind fettgedruckt

7.2. Mikroskopischer Erregernachweis in nach Giemsa gefärbten Kunststoffschnitten

Von den Organen Lunge, Leber und Niere sowie vom Knochenmark wurden Proben entnommen und in Kunststoff eingebettet. Die angefertigten Schnitte wurden nach Giemsa gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht. Es ergab sich im Vergleich zu anderen Methoden eine sehr gute Darstellbarkeit des Erregers im nach Giemsa gefärbten Kunststoffschnitt (Abb. 35).

In den nach Giemsa gefärbten Kunststoffschnitten konnte bei zwei der sieben Tiere

(Tier 23 und 32) in allen untersuchten Organen *M. suis* detektiert werden (Abb. 36). Bei den anderen fünf Tieren (Tier 31, 71, 73, 74 und 76) wurde *M. suis* nicht nachgewiesen.

In dieser Färbung konnte der Erreger ausschließlich Erythrozyten-assoziiert dargestellt werden.

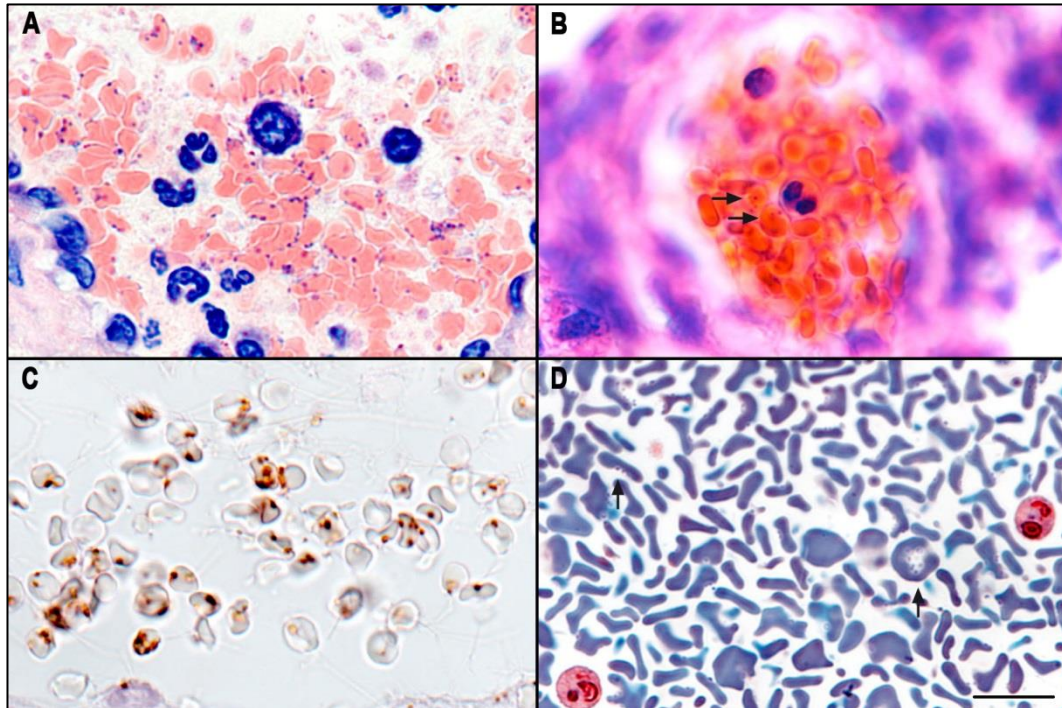


Abbildung 35: Die Montage zeigt die verschiedenen lichtmikroskopischen Nachweisverfahren für *M. suis*

A. Darstellung der Erreger in Kunststoff eingebettetem Gewebe und der Färbung der Schnitte nach Giemsa.

B. Im nach Giemsa gefärbten Paraffin-Schnitt sind die Erreger kaum zu erkennen (Pfeile).

C. Deutlich zu erkennen sind die Mykoplasmen in der verwendeten Immunhistochemie mit einem nicht-kommerziellen Antikörper.

D. Semidünnschnitt mit einer Safranin-Toluidinblau-Färbung, die Erreger sind trotz der hohen Schnittqualität nicht ganz leicht aufzufinden (Pfeile).

Alle Präparate stammen von Tier 23, die Abb. A bis C von Lebergewebe und die Abb. D von in Epon eingebettetem Blut; der Maßstab für alle Abb. = 10 µm

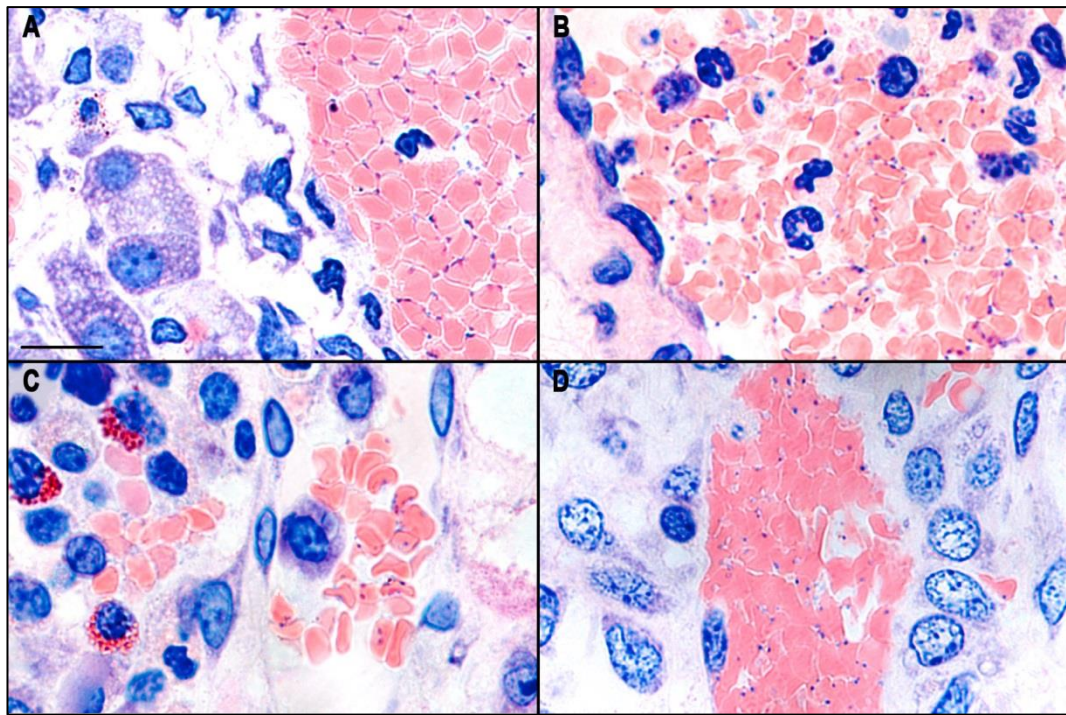


Abbildung 36: Nachweis von *M. suis* auf Erythrozyten mit Hilfe von in Kunststoff eingebetteten Geweben in der Färbung nach Giemsa

Dargestellt sind Leber (A), Lunge (B), Knochenmark (C) und Niere (D). Kunststoffeinfbettung, Giemsa-Färbung, Maßstab für A bis D = 10 μm , Tier 23

7.3. Ergebnisse der Immunhistochemie

Es konnte mittels Immunhistochemie *M. suis* auf den Erythrozyten in den Gefäßen der Leber von Tier 23 dargestellt werden (Abb. 37). Der Nachweis gelang einmalig mit dem Protokoll nach SOKOLI und Mitarbeiter (2013) und dem polyklonalen anti- α -Enolase-Kaninchenimmunserum in einer Verdünnung von 1:200. Trotz verschiedener Protokollanpassungen gelang es nicht, dieses Ergebnis zu reproduzieren.

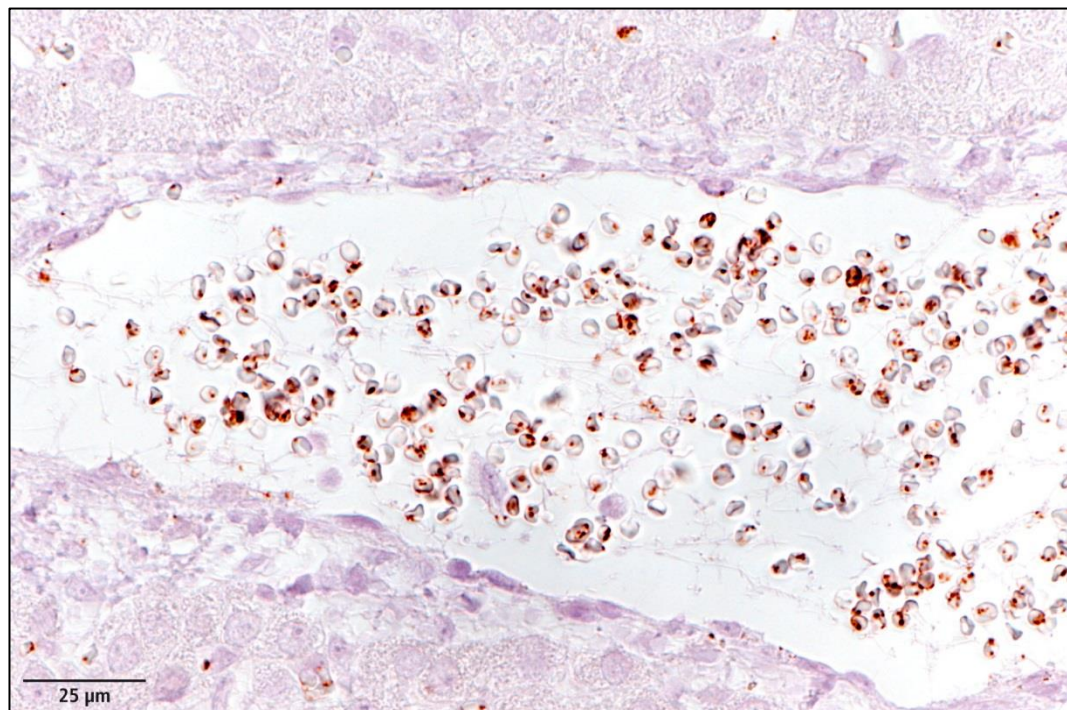


Abbildung 37: Nachweis von *M. suis* in der Leber von Tier 23 mittels Immunhistochemie

V. DISKUSSION

Aufgrund der Unkultivierbarkeit von *M. suis* ist das Wissen über die Pathomechanismen einer *M. suis*-Infektion bislang noch sehr begrenzt (HOELZLE et al., 2014). Da sich die Bakterien in der Kultur nicht vermehren, können keine *in vitro*-Versuche zur Wirt-Pathogen-Interaktion durchgeführt werden. Daher beruhen bisherige Erkenntnisse vor allem auf Untersuchungen an splenektomierten, experimentell infizierten Schweinen. Dennoch konnten durch die Etablierung neuer molekularer Technologien in den letzten Jahren neue Einblicke in die Adhäsions- und Invasionsvorgänge, die Ausscheidungswege, den Zelltropismus und die Immunpathologie von *M. suis* gewonnen werden (HOELZLE, 2008; HOELZLE et al., 2014).

SOKOLI und Mitarbeiter (2013) konnten in einer Untersuchung mit dem hochinvasiven *M. suis*-Stamm KI3806 erstmals eine direkte Interaktion von *M. suis* mit den Endothelzellen der Blutgefäße infizierter Tiere feststellen und diese somit als weitere Wirtszelle neben den Erythrozyten identifizieren. Bisher wurde von einer starken Adaptation des Erregers ausschließlich an Erythrozyten ausgegangen (HOELZLE, 2008). Dies lässt die Vermutung zu, dass möglicherweise noch weitere potentielle Wirtszellen von *M. suis* vorliegen könnten. Zusätzlich konnte in einer neuen, auf molekularen Methoden basierenden Untersuchung *M. suis*-DNA im Urin, Speichel, Nasen- und Vaginalsekret infizierter Tiere nachgewiesen werden (DIETZ et al., 2014). Somit erscheinen bisher nicht in Betracht gezogene, blut-unabhängige Übertragungswege für *M. suis* denkbar.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Verteilungsmuster von *M. suis* im Körper sowie innerhalb verschiedener Organe hinsichtlich potentieller weiterer Wirtszellen untersucht. Die dafür vorgenommene experimentelle Infektion von den splenektomierten Tieren der Gruppe I mit dem *M. suis*-Feldstamm K323/13 wurde unter Betrachtung der klinischen, hämatologischen, pathologischen und histopathologischen Veränderungen im zeitlichen Verlauf dargestellt. Zusätzlich wurde bei den Tieren aus Gruppe II die Möglichkeit der Übertragung von *M. suis* durch die orale Aufnahme erregerehaltigen Blutes untersucht.

1. Verlauf der Infektion mit dem *M. suis*-Feldstamm K323/13 nach parenteraler Infektion

1.1. Klinischer Verlauf der *M. suis*-Infektion

In der vorliegenden Studie konnten die ersten Anzeichen einer akuten IAP an Tag 7 p.i. festgestellt werden. Diese Zeitspanne deckt sich mit den in früheren Untersuchungen festgestellten Inkubationszeiten bei splenektomierten, experimentell infizierten Schweinen. So konnte HEINRITZI (1990a) bei Tieren derselben Altersgruppe eine Inkubationszeit von im Mittel 7,1 Tagen ermitteln. In der Untersuchung von GLONEGGER-REICHERT (2015) mit dem auch hier verwendeten *M. suis*-Feldstamm K323/13 ergab sich eine Inkubationszeit von nur 6 Tagen. STADLER und Mitarbeiter (2014) konnten bei Untersuchungen zur Infektionsdynamik des hochvirulenten *M. suis*-Isolats KI3806 eine noch kürzere Inkubationszeit von nur 5 Tagen feststellen. Allerdings verwendeten sie eine höhere Infektionsdosis und infizierten die Tiere parenteral mit 2 ml Blut, welches eine Erregermenge von 10^8 *M. suis*/ml Blut enthielt (STADLER et al., 2014). Die Inkubationszeit hängt grundsätzlich von verschiedenen Faktoren ab, wie etwa der Immunlage des einzelnen Tieres, der Infektionsdosis und der Virulenz des Erregerstammes. Sie kann somit individuell sehr unterschiedlich sein (HOELZLE, 2008).

In vorhergehenden Untersuchungen mit dem Feldstamm K323/13 konnte nur ein Einzeltier über 90 Tage und somit auch im chronischen Infektionsverlauf beobachtet werden (GLONEGGER-REICHERT, 2015). Im Gegensatz dazu konnten wir in der hier durchgeführten Studie den Infektionsverlauf bei vier Tieren über einen längeren Zeitraum verfolgen. Es zeigte sich regelmäßig wiederkehrend eine akute IAP mit der in der Literatur beschriebenen Klinik. Die Intervalle zwischen den Anfällen lagen bei mindestens 5 und längstens 17 Tagen. Die von HEINRITZI (1990a) beschriebene, mit zunehmender Infektionsdauer einhergehende Verlängerung der Intervalle zwischen den Anfällen konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht grundsätzlich bestätigt werden. Betrachtet man die zwei Tiere, die am längsten überlebt haben (Tier 31 und 71), kann man starke individuelle Unterschiede im Infektionsverlauf erkennen. Bei Tier 31 verlängerten sich die Intervalle wie bei HEINRITZI (1990a) beschrieben von Anfall zu Anfall von anfangs 5 Tagen auf 11 Tage zwischen dem dritten und vierten Anfall. Dagegen

konnten bei Tier 71 insgesamt deutlich längere Zwischenintervalle von mindestens 9 und längstens 17 Tagen festgestellt werden, wobei die längste Zeitspanne zwischen dem zweiten und dritten Anfall lag. GLONEGGER-REICHERT (2015) konnte eine Verlängerung der Intervalle zwischen den Anfällen erst nach dem fünften Anfall an Tag 55 p. i. feststellen. Da im vorliegenden Fall beide Tiere bereits im vierten Anfall euthanasiert wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es im weiteren Infektionsverlauf doch noch zu einer regelmäßigen Verlängerung der Zeiträume zwischen den akuten Anfällen gekommen wäre. HEINRITZI (1990a) betont nach seinen Untersuchungen, dass es zwar im Mittel zu einer Verlängerung der Intervalle kommt, individuell aber große Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren festzustellen sind.

In der vorliegenden Studie ebenfalls nicht bestätigt werden konnte die Aussage, dass es mit zunehmender Infektionsdauer zu einer Verminderung der Intensität der Anfälle kommt (HEINRITZI, 1990a). Im ersten Anfall an Tag 7 und 8 p. i. konnte bei den 3 akut erkrankten Tieren jeweils ein klinischer Gesamtscore von 7 festgestellt werden. Im zweiten Anfall an den Tagen 17 bis 20 p. i. ergab sich ein klinischer Gesamtscore von 9 – 10 und auch im vierten Anfall wies Tier 31 noch einen Gesamtscore von 8 auf. Es konnte somit eher eine Zunahme der Intensität der klinischen Symptome mit einem Maximum im zweiten Anfall festgestellt werden.

Auffallend in dieser Studie war das sehr frühe Auftreten von *Morbus maculosus*. Dieser war bei Tier 23 bereits im ersten Anfall an Tag 7 p. i. festzustellen, bei Tier 31 ab Tag 13 p. i.. In der Literatur wurde er bisher als Symptom des chronischen Verlaufs einer *M. suis*-Infektion beschrieben (HEINRITZI, 1984a). In Untersuchungen von JANNASCH (2014) trat er bei nicht splenektomierten Schweinen 17 Tage nach der Infektion mit dem *M. suis*-Isolat KI3806 auf. Dieses frühe Auftreten führte JANNASCH (2014) auf die hochvirulenten Eigenschaften des Isolats KI3806 zurück.

Als *Morbus maculosus* (auch Blutfleckenkrankheit oder *Purpura haemorrhagica*) wird eine durch das Auftreten von hämorrhagischer Diathese und Ödemen gekennzeichnete Erkrankung unterschiedlicher Genese bezeichnet (WIESNER und FÜRL, 2000). Sie ist sowohl in der Human- wie auch in der Tiermedizin beschrieben. In der Tiermedizin findet sich die Bezeichnung *Morbus maculosus equorum* für eine immunvermittelte Entzündung der Gefäßwand mit dem klinischen Bild der hämorrhagischen Diathese beim Pferd (FEY, 2006). *Morbus*

maculosus equorum kann sowohl als primärer Prozess, z. B. bei der Equinen Virusarteritis, wie auch als sekundäre Erscheinung bei bakteriellen und viralen Infektionen und allergischen Reaktionen auftreten. Besonders häufig ist er mit einer Streptokokkeninfektion assoziiert (FEY, 2006). Im Falle eines sekundären Auftretens des *Morbus maculosus* kommt es zur Bildung von Immunkomplexen, welche sich an den Gefäßwänden ablagern und das Komplementsystem aktivieren. Dies führt zu Gefäßwandläsionen, aus denen Ödeme, Blutungen und ischämische Schäden des umliegenden Gewebes resultieren (FEY, 2006). Auch beim Pferd wird der *Morbus maculosus* als eine im späten Stadium oder erst nach Abheilung der klinische Streptokokkeninfektion (Druse) auftretende Krankheitserscheinung beschrieben (FEY, 2006). In der Humanmedizin ist die Erkrankung unter dem Namen *Morbus maculosus* Werlhof oder Thrombozytopenische Purpura bekannt. Sie ist gekennzeichnet durch das Auftreten von Petechien und Ekchymosen in Haut, Schleimhäuten, Organen und auf Serosen (SMITH BURT 1900). Vorwiegend sind Kinder betroffen (SMITH BURT 1900). Zugrundeliegend ist eine immunvermittelte Blutgerinnungsstörung, bei der es zu der Bildung von antithrombozytären Autoantikörpern kommt (SEMPLE et al., 1996). Es werden akute und chronische Verlaufsformen der Erkrankung beschrieben. Die akute Form tritt häufig sekundär bei viralen oder bakteriellen Infektionen auf und heilt nach ca. 6 Wochen spontan aus. Bei ca. 20 % der akut erkrankten Patienten geht sie in eine chronische Form mit persistierender Thrombozytopenie über (SEMPLE et al., 1996).

Der Pathogenese des *Morbus maculosus* bei einer *M. suis*-Infektion liegen vermutlich verschiedene Mechanismen zugrunde. PLANK und HEINRITZI (1990) sehen als Ursache des Hämostasedefekts eine intravasale Umsatzstörung in Form einer disseminierten intravasalen Gerinnung (Verbrauchskoagulopathie). Zur Aktivierung der Gerinnungskaskade tragen vermutlich verschiedene Faktoren bei. Als solche kommen die Schädigung von Erythrozyten durch den Erreger, Gefäßwandschäden durch die hypoxisch-azidotische Stoffwechsellage sowie die Aktivierung des Komplementsystems durch zirkulierende Antigen-Antikörper-Komplexe in Frage. In neueren Untersuchungen konnte nun erstmals die direkte Interaktion von *M. suis* mit Zellen des Gefäßendothels infizierter Tiere nachgewiesen werden (SOKOLI et al., 2013). Diese ist mit einer ausgedehnten Zerstörung und Aktivierung des Endothels verbunden und führt zu einer

vermehrten Durchlässigkeit der Gefäßwände für Blutbestandteile (SOKOLI et al., 2013). Somit erscheint als Ursache für die mit einer *M. suis*-Infektion assoziierten Hautveränderungen eine Kombination aus disseminierter intravasaler Gerinnung und direkter Schädigung des Gefäßendothels durch *M. suis* denkbar.

1.2. Verlauf der *M. suis*-Bakteriämie

Bei drei Tieren (23, 74 und 76) der Gruppe I konnte erstmals an Tag 4 p. i. *M. suis*-DNA im Blut nachgewiesen werden. An Tag 6 p. i. waren alle Tiere in der *M. suis*-spezifischen, quantitativen PCR positiv. Bei JANNASCH (2014) konnte hingegen bereits an Tag 2 p. i. bei allen Tieren *M. suis*-DNA im Blut nachgewiesen werden, bei GLONEGGER-REICHERT (2015) an Tag 4 *post infectionem*. JANNASCH (2014) verwendete zur Infektion das hochvirulente *M. suis*-Isolat KI3806 sowie eine höhere Infektionsdosis als in der hier vorliegenden Studie. Bei JANNASCH (2014) wurden die Tiere parenteral mit 2 ml Blut infiziert, welches eine Erregermenge von 10^8 *M. suis*/ml Blut enthielt. In der hier vorliegenden Studie wurden 1,5 ml Blut mit einer Erregermenge von $2,0 \times 10^7$ *M. suis*/ml Blut ebenfalls subkutan injiziert. Sowohl die Virulenz als auch die Infektionsdosis werden als wichtige Faktoren für die Dauer der Inkubationszeit bei einer Infektion mit *M. suis* angesehen (HOELZLE, 2008). Bei GLONEGGER-REICHERT (2015) zeigten drei Tiere bereits am Tag der Infektion eine geringgradige Blässe der Haut und der Schleimhäute. Eventuell könnte diese auf eine bereits *prae infectionem* geschwächte Immunlage zurückzuführen sein, welche die schnellere Erregervermehrung begünstigt haben könnte. HOELZLE (2008) gibt die Immunlage des Einzeltieres als weiteren wichtigen Faktor in Bezug auf die Inkubationszeit an. Wie bei GLONEGGER-REICHERT (2015) zeigte sich in der hier vorliegenden Untersuchung ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Erregermenge im Blut und dem Todeszeitpunkt. Die drei Tiere (23, 32, 76), die an Tag 6 p. i. bereits Erregermengen von $\geq 2,1 \times 10^5$ *M. suis*/ml Blut aufwiesen, entwickelten an Tag 7 und 8 p. i. eine ausgeprägte akute IAP und wurden euthanasiert bzw. verendeten, während die Tiere, die an Tag 6 p. i. eine geringere Erregermenge im Blut aufwiesen, überlebten. Anders als bei GLONEGGER-REICHERT (2015) beschrieben, zeigten auch die über mehrere Anfälle überlebenden Tiere (Tier 31 und 71) trotz zwischenzeitlicher antibiotischer Behandlung zu keinem Zeitpunkt der Infektion ein negatives Ergebnis in der *M. suis*-spezifischen, quantitativen PCR. Der niedrigste Wert wurde mit

$5,0 \times 10^1$ *M.suis*/ml Blut an Tag 56 p. i. bei Tier 71 gemessen. Dies bestätigt die Aussagen in der Literatur, wonach eine antibiotische Therapie nicht zu einer Eliminierung des Erregers führt (HEINRITZI, 1984a; HOELZLE, 2007). Einmal mit *M. suis* infizierte Tiere bleiben ein Leben lang asymptomatische Trägartiere, bei denen die Erkrankung jederzeit wieder aufflammen kann (HOELZLE, 2007).

1.3. Auswirkungen der *M. suis*-Infektion auf die untersuchten Blutparameter

Zusätzlich zum klinischen Verlauf der Infektion und dem Verlauf der *M. suis*-Bakteriämie wurden Auswirkungen der Infektion auf die hämatologischen und klinisch-chemischen Blutparameter untersucht.

Vor allem bei den drei an Tag 7 und 8 p. i. verstorbenen Tieren (Tier 23, 32 und 76) zeigte sich deutlich der auch von HOELZLE und Mitarbeiter (2009) und STADLER und Mitarbeiter (2014) beschriebene Zusammenhang zwischen der Erregermenge im Blut und dem Abfall der hämatologischen Parameter Erythrozytenzahl, Hämoglobin und Hämatokrit. Das Blutbild entsprach dem einer normochromen, normozytären Anämie, welche auch in der Literatur als vorherrschende Anämieform bei einer *M. suis*-Infektion beschrieben wird (HEINRITZI, 1984a; PETERANDERL, 1988; HEINRITZI, 1990a).

Dem Auftreten der Anämie während einer klinischen *M. suis*-Infektion liegen verschiedene Pathomechanismen zugrunde. Die direkte Interaktion (Adhäsion und Invasion) von *M. suis* mit seiner Wirtszelle Erythrozyt verursacht Schäden an der Zellmembran der Erythrozyten. Dies führt entweder zur direkten intravasalen Lyse der Erythrozyten oder zu deren Phagozytose durch Zellen des mononukleären Phagozytosesystems (extravasale Hämolyse) (FELDER et al., 2011; HOELZLE et al., 2014). Zusätzlich kommt es durch die Interaktion von Bakterium und Erythrozyt zu einer vermehrten Eryptose betroffener Erythrozyten (FELDER et al., 2011). Ein weiterer bedeutender Pathomechanismus bei der Entstehung der Anämie ist die Bildung von autoreaktiven Antikörpern der Klassen IgG und IgM gegen Erythrozytenantigene (HOELZLE et al., 2014).

Ab Tag 7 p. i. konnte bei allen Tieren jeweils zum Zeitpunkt einer klinisch akuten IAP eine gering- bis hochgradige Bilirubinämie nachgewiesen werden. Bisher wurde angenommen, dass der deutliche Anstieg der Bilirubinkonzentration im Blut vor allem durch die während der *M. suis*-Infektion auftretende ausgeprägte

Hämolyse verursacht wird (HEINRITZI, 1984a). Beim Hämoglobinabbau entsteht primäres Bilirubin (indirektes Bilirubin, Bilirubin I). Dieses wird dieses an Albumin gebunden und gelangt mit dem Blut in die Leber, wo es durch die Glukuronyltransferase zum sekundären Bilirubin (direktes Bilirubin, Bilirubin II) konjugiert und über die Galle sezerniert wird. 85 % des direkten Bilirubins werden mit dem Kot ausgeschieden, 15 % werden im Darm deglukuroniert, resorbiert und enterohepatisch rezirkuliert (NEUMANN, 2013; SILBERNAGEL, 2013b). Kommt es durch eine hochgradige Hämolyse zu einer gesteigerten Produktion von Bilirubin, ist die Leber nicht mehr in der Lage dieses vollständig zu verstoffwechseln (HEINRITZI, 1984a). Im Blut fällt dann vermehrt indirektes, unkonjugiertes Bilirubin an (SILBERNAGEL, 2013b). Als mögliche Ursachen für eine erhöhte Bilirubinkonzentration im Blut kommen aber auch intrahepatische sowie posthepatische Störungen des Bilirubinstoffwechsels in Frage (NEUMANN, 2013; SILBERNAGEL, 2013b). Um die Ursache für den teils massiven Anstieg der Bilirubinkonzentration im Blut während der *M. suis*-Infektion genauer einzugrenzen, wurde in der hier vorliegenden Studie nicht nur die Konzentration des Gesamtbilirubins, sondern auch die des direkten Bilirubins gemessen. Die Konzentration des indirekten Bilirubins wurde anschließend durch die Subtraktion des direkten Bilirubins vom Gesamtbilirubin bestimmt (NEUMANN, 2013). Dabei zeigte sich bei drei von sieben Tieren (Tier 23, 31 und 32) zum Zeitpunkt der maximalen Hyperbilirubinämie eine prozentual gleichmäßige Aufteilung in direktes und indirektes Bilirubin. Bei zwei Tieren (Tier 71 und 73) überwog mit 78,4 % und 83,0 % der Anteil an indirektem Bilirubin, bei zwei Tieren (Tier 74 und 76) mit 82,5 % und 62,5 % der Anteil an direktem Bilirubin an der Gesamtbilirubinkonzentration im Blut. Eine alleinige Erhöhung des indirekten Bilirubins im Blut ist hinweisend auf einen prähepatischen Ikterus (NEUMANN, 2013; SILBERNAGEL, 2013b). Allerdings kann es bei einem prähepatischen Ikterus nachfolgend auch zu einer raschen Erhöhung des direkten Bilirubins kommen (NEUMANN, 2013). Bei Tier 71 und 73 erscheint somit die Hämolyse als Grund für die Hyperbilirubinämie durchaus denkbar. Bei den anderen fünf Tieren, die eine zeitgleiche Erhöhung von indirektem und direktem Bilirubin zeigten, erscheint eine intrahepatische Ursache wahrscheinlicher. Bei einem intrahepatischen Ikterus kann es durch eine gestörte Aufnahme von indirektem Bilirubin in die Hepatozyten oder einen spezifischen Defekt bei der Konjugation zu einem Anstieg des indirekten Bilirubins sowie durch eine Störung der Sekretion in

die Gallengänge zu einer Erhöhung des direkten Bilirubins kommen (ROCHE und KOBOS, 2004; SILBERNAGEL, 2013b). Ein häufiger Grund für einen gestörten Abtransport des direkten Bilirubins aus den Hepatozyten sind entzündliche Prozesse in der Leber (ROCHE und KOBOS, 2004). In der histopathologischen Untersuchung der Leber wurde bei drei Tieren (Tier 23, 71 und 76) eine geringgradige reaktive interstitielle Hepatitis sowie bei zwei Tieren (Tier 73 und 74) die Nekrose von Leberzellen festgestellt.

Zusätzlich zur Bilirubinkonzentration wurde auch die Aktivität verschiedener Enzyme gemessen, die in der Medizin als Indikatoren für eine Erkrankung der Leber genutzt werden. Hierbei fiel zuerst die bei allen sieben Tieren dauerhaft deutlich oberhalb des Referenzbereiches nach (NERBAS, 2008) liegende Verlaufskurve der γ -GT-Aktivität im Serum auf. Die γ -GT ist ein leberspezifisches Enzym, dessen Serumaktivität vor allem bei Cholestasen erhöht ist (NEUMANN, 2013). Der Referenzbereich nach NERBAS (2008) liegt bei 9,8 bis 28 U/l. Andere Autoren geben mit 45,6 U/l (KIXMÖLLER, 2004) bzw. 45 U/l (MORITZ et al., 2013a) einen deutlich höheren Grenzwert für die γ -GT-Aktivität an. Bei den Tieren der Gruppe II, die negativ für *M. suis* getestet wurden und keinerlei klinische Anzeichen einer Leberschädigung zeigten, ließ sich eine im Mittel ebenfalls deutlich über dem Referenzbereich liegende γ -GT-Aktivität feststellen. Daher scheint diesem Befund keine weitere Aussagekraft zuzukommen.

Vor allem bei Tier 74 fiel die zeitgleiche starke Erhöhung von AP- und AST-Aktivität im Serum auf. Bei zwei weiteren Tieren (Tier 31 und 73) kam es jeweils zum Zeitpunkt einer akuten IAP zu einer Erhöhung der AST-Aktivität. Sowohl die AP als auch die AST werden, obwohl nicht leberspezifisch, zur Diagnostik von Lebererkrankungen hinzugezogen, da sich ihre Aktivität bei einer Cholestase bzw. einer Leberzelldegeneration erhöht (NEUMANN, 2013). Die Aktivität der AST steigt auch bei Skelettmuskelerkrankungen an, daher wurde zur weiteren Differenzierung der Ursache die CK-Aktivität hinzugezogen und der CK/AST-Quotient berechnet. Die CK ist ein muskelspezifisches Enzym, dessen Aktivität bei Muskeltraumen, Tetanus und Belastungsmypopathien ansteigt (BAUER und NEUMANN, 2013). Ein CK/AST-Quotient von 20 bis 50 deutet beim Schwein auf verletzungsbedingte Muskelschäden hin, ein Quotient von > 50 auf belastungsbedingte Muskelschäden und ein Quotient von < 20 auf eine Leberzelldegeneration (BICKHARDT, 2001; NEUMANN, 2013).

Bei den Tieren 31 und 73 zeigte sich zu den fraglichen Zeitpunkten eine Erhöhung der CK-Aktivität, bei Tier 74 verblieb sie im Referenzbereich. Auch die Tiere 32, 71 und 76 zeigten zu Zeiten einer akuten IAP eine gesteigerte Aktivität der CK.

Bei Tier 74 ergab sich ein CK/AST-Quotient von 1,65. Die Kombination aus dem niedrigen CK/AST-Quotienten, dem hohen Anteil an direktem Bilirubin (82,46 % vom Gesamtbilirubin) und der Erhöhung der AP-Aktivität deuten auf eine Leberzellschädigung bei diesem Tier hin. Diese konnte in der histopathologischen Untersuchung bestätigt werden.

Bei den anderen fünf Tieren mit erhöhter AST- und/oder CK-Aktivität besteht nach den Ergebnissen der Blutuntersuchung eher der Verdacht auf eine Muskelzellschädigung. Ein möglicher Grund für eine Muskelzellschädigung während einer Infektion mit *M. suis* könnten autoreaktive Prozesse sein, die sich gegen das in den Muskelzellen enthaltene Aktin (α -Aktin) richten. FELDER und Mitarbeiter (2010) konnten in ihrer Untersuchung die Bildung von Autoantikörpern gegen porcines α - und β -Aktin während einer *M. suis*-Infektion nachweisen. Zu einem Anstieg der CK-Aktivität im Serum kommt es aber beispielsweise auch bei Krampfanfällen (BAUER und NEUMANN, 2013). Drei der Tiere (32, 73 und 76) zeigten jeweils zum Zeitpunkt einer Erhöhung der CK-Aktivität im Serum Symptome wie tonische Krämpfe, Zittern und Tremor. Diese könnten wiederum durch die hohe innere Körpertemperatur während einer akuten IAP verursacht werden. SILBERNAGEL (2013a) beschreibt sowohl Zittern als auch zerebrale Krämpfe als mögliche Folgen von Fieber.

Zum Zeitpunkt einer klinisch akuten IAP entwickelten die Tiere eine teilweise hochgradige Hypoglykämie. Besonders deutlich wurde diese bei den an Tag 7 und 8 p. i. verstorbenen Tieren (Tier 23, 32, 76). Hier konnten hochgradig erniedrigte Blutglukosewerte mit einem Minimum von nur 0,2 mmol/l gemessen werden. Erniedrigte Blutglukosewerte konnten aber auch im chronischen Infektionsverlauf bei Tier 71 regelmäßig zum Zeitpunkt der akuten Anfälle festgestellt werden. In vorangegangenen Untersuchungen wurden bei allen Tieren zum Zeitpunkt der akuten IAP hochgradig erniedrigte Glukosewerte gemessen (JANNASCH, 2014; GLONEGGER-REICHERT, 2015). Dass dies in der hier vorliegenden Untersuchung nicht der Fall war, beruht vermutlich auf dem Umstand, dass eine Blutentnahme teilweise erst nach Stabilisierung des Allgemeinzustandes möglich war. Zu der in diesem Fall eingeleiteten Therapie zählte unter anderem auch die

orale Substitution von Glukose. Der massive Abfall der Blutglukose während einer akuten IAP ist typisch und bereits ausführlich in der Literatur beschrieben (HEINRITZI, 1984a; PETERANDERL, 1988; STADLER et al., 2014). Durch Analysen der Genomsequenzen sowie des Proteoms von *M. suis* konnte nachgewiesen werden, dass *M. suis* alle notwendigen Komponenten zur Aufnahme und Verstoffwechselung von Glukose besitzt und dass Glucose offensichtlich das wichtigste Substrat des Kohlenstoffwechsels ist (GUIMARAES et al., 2011b; OEHLERKING et al., 2011; DO NASCIMENTO et al., 2014; DIETZ et al., 2016). Durch die schnelle Erregervermehrung und den damit verbundenen starken Glukoseverbrauch durch *M. suis* während einer akuten IAP kommt es offenbar zu der hochgradigen Hypoglykämie, der allein durch Glukoneogenese vom Wirtstier nicht mehr entgegengewirkt werden kann.

Bei fünf Tieren kam es zum Zeitpunkt einer akuten IAP zu einem Anstieg der Harnstoffkonzentration im Serum. Verschiedene Autoren führen diese auf eine Funktionsbeeinträchtigung der Niere in Folge einer intravasalen Ablagerung von erregerinduzierten Mikrothromben zurück (PLANK und HEINRITZI, 1990; JANNASCH, 2014; GLONEGGER-REICHERT, 2015). Da in der histopathologischen Untersuchung bei keinem der fünf Tiere eine Thrombosierung der Nierengefäße festgestellt werden konnte, dürfte hier eine andere Ursache für die Erhöhung der Harnstoffwerte vorliegen. Zu einem erhöhten Harnstoffgehalt im Blut kommt es beispielsweise auch bei Fieber oder Dehydratation (MORITZ et al., 2013b). Da die betroffenen Tiere zum Zeitpunkt der erhöhten Harnstoffkonzentration im Serum eine innere Körpertemperatur von bis zu 41,9 °C sowie Anorexie aufwiesen, stellt beides eine mögliche Erklärung für die Veränderung der Harnstoffwerte dar.

Bei sechs Tieren kam es jeweils zum Zeitpunkt einer akuten IAP zu einem deutlichen Abfall der Eisenkonzentration im Blut. Dies bestätigt die Befunde verschiedener vorhergegangener Untersuchungen (HEINRITZI, 1984a; BRAUN, 1985; GLONEGGER-REICHERT, 2015). BRAUN (1985) führt den Abfall der Serumeisenkonzentration auf die Folgen der Hämolyse zurück: Das vorhandene Eisen wird für die Erythropoese benötigt. HEINRITZI (1984a) erklärt den Befund mit der Speicherung des Eisens am Ort der Erythrophagozytose bei extravasaler Hämolyse. In der histopathologischen Untersuchung der Tiere aus Gruppe I konnte sowohl eine gesteigerte Erythropoese im Knochenmark, als auch eine Ablagerung

von Hämosiderin in den Makrophagen verschiedener Organe nachgewiesen werden. Eine weitere plausible Erklärung für den Abfall der Serumeisenkonzentration während einer akuten IAP wäre der Metabolismus von *M. suis*. Alle pathogenen Bakterien benötigen Eisen als essentiellen Nährstoff für Vermehrung und Wachstum (MIETZNER und MORSE, 1994). Auch von *M. suis* ist bekannt, dass es diverse essentielle Nährstoffe von seinem Wirt bezieht (HOELZLE et al., 2014). Durch Sequenzanalysen des *M. suis*-Genoms konnte bestätigt werden, dass Transportsysteme für die Aufnahme verschiedener Eisenkomplexe wie Hämin und Ferrichrom codiert werden (GUIMARAES et al., 2011b; FELDER et al., 2012).

1.4. Pathologische und histopathologische Veränderungen

In der pathologischen und histopathologischen Untersuchung der Tiere aus Gruppe I konnten keine direkt erregurbedingten Veränderungen festgestellt werden. Die festgestellten Veränderungen traten vermutlich in Folge der während einer akuten IAP auftretenden Hämolyse mit nachfolgender Anämie, immunmedierten Entzündungsmechanismen sowie einer Gerinnungsstörung in Form einer disseminierten intravasalen Gerinnung auf. Dies bestätigt die Ergebnisse vorhergegangener Untersuchungen zur Pathologie bei Hämoplasmeninfektionen. DENT und Mitarbeiter (2013) stellten bei einem mit *M. suis*-infizierten Tier blasse Schleimhäute und Leberveränderungen fest, konnten aber keine pathognomonischen Veränderungen identifizieren. In der mikroskopischen Untersuchung der Organe von *M. haemofelis*-infizierten Katzen in der Untersuchung von TASKER und Mitarbeiter (2009) zeigten sich ebenfalls ausschließlich Anämie-bedingte Veränderungen wie zentrolobuläre Leberzelldegenerationen und eine gesteigerte Erythropoese im Knochenmark. Im Folgenden werden die bei den Tieren der Gruppe I nachgewiesenen pathologischen und histopathologischen Veränderungen noch einmal ausführlich besprochen.

Sowohl bei der klinischen Untersuchung als auch bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung fiel vor allem bei den Tieren 73 und 74 die hochgradige Iktereanämie auf. Bei Tier 73 konnten histopathologisch zentrolobuläre Leberzellnekrosen sowie eine ebenfalls zentrolobuläre Verfettung der Leberzellen nachgewiesen werden. Das Auftreten von zentrolobulären Leberzellnekrosen bei mit *M. suis* infizierten Tieren wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben (CLAXTON und KUNESH, 1975; HOFFMANN und

SAALFELD, 1977; THIEL, 1983; PLANK und HEINRITZI, 1990). Eine der häufigsten Ursachen für zentrolobuläre Leberzelldegenerationen ist eine Hypoxie des Gewebes. Die um die Zentralvene des Leberläppchens lokalisierten Hepatozyten sind dem Sauerstoff und essentielle Nährstoffe enthaltenden arteriellen und portalen venösen Blut am fernsten und daher besonders anfällig für Schädigungen durch Hypoxie (STALKER und HAYES, 2007; MUNDHENK und WOHLSEIN, 2015). Die Hypoxie tritt entweder in Folge einer Anämie oder eines venösen Rückstaus des Blutes auf (STALKER und HAYES, 2007). THIEL (1983) geht bei einer *M. suis* Infektion von einer hypoxischen Schädigung der zentralen Läppchenanteile in Folge der Anämie aus, während PLANK und HEINRITZI (1990) die Ursache der Nekrosen in einer Gewebhypoxie durch die intravasale Ablagerung von Gerinnungsprodukten sehen. Beides könnte im Fall von Tier 73 ursächlich sein: in der hämatologischen Untersuchung zeigte sich zum Zeitpunkt der Euthanasie eine normochrome, normozytäre Anämie und in der histopathologischen Untersuchung konnten in den Lebersinusoiden hyaline Kügelchen als Anzeichen einer intravasalen Gerinnung nachgewiesen werden.

In der Leber von Tier 74 wurden hingegen peripherlobuläre Einblutungen und Leberzellnekrosen festgestellt. Peripherlobuläre Leberzellnekrosen wurden bisher im Zusammenhang mit einer *M. suis*-Infektion nur in der Untersuchung von GLONEGGER-REICHERT (2015) beschrieben. In diesem Fall wurde derselbe *M. suis*-Feldstamm zur Infektion genutzt wie in der hier vorliegenden Studie. Periphere Leberzellnekrosen treten vor allem nach der oralen Aufnahme oder systemischen Applikation direkt wirksamer Toxine, zum Beispiel von Metallen, auf (MUNDHENK und WOHLSEIN, 2015). Diese Stoffe gelangen über die Portalvene bzw. das arterielle Blutsystem in die Leber und schädigen daher zuerst die peripheren Leberzellen. Bei einer direkten Intoxikation kommt es in der Regel zusätzlich zur Beeinträchtigung anderer Organsysteme. Erbrechen und Durchfall sind Anzeichen einer Schädigung des Magen-Darm-Trakts und häufig liegt eine hochgradige Schädigung der Nieren vor (SHERLOCK, 1968). Eine direkte Intoxikation als Ursache der peripherlobulären Leberzellnekrosen kann bei Tier 74 ausgeschlossen werden. Es wurden keine lebertoxischen Substanzen appliziert und eine futtermittelbedingte Intoxikation hätte auch die anderen Tiere der Gruppe betreffen müssen. Hinzu kommt das Fehlen von weiteren Symptomen wie Erbrechen. Eventuell könnte das Auftreten der peripherlobulären

Leberzellnekrosen auch immunmediert sein. In der Literatur werden die sogenannten „piecemeal necrosis“ der peripheren Leberzellen beschrieben. Ihnen liegt meist eine autoimmune Pathogenese zugrunde (MUNDHENK und WOHLSEIN, 2015). Als zur Nekrose führende Mechanismen werden sowohl die direkte Schädigung der Hepatozyten durch die Aufnahme von Antigen-Antikörper-Komplexen als auch eine zell-mediierte Zerstörung durch Makrophagen und T-Lymphozyten diskutiert (STALKER und HAYES, 2007).

In der histopathologischen Untersuchung der Leber wurde bei drei der sieben Tiere (Tier 23, 71 und 76) eine geringgradige unspezifische reaktive interstitielle Hepatitis unter Beteiligung von Lymphozyten, Plasmazellen, eosinophilen und basophilen Granulozyten sowie Makrophagen festgestellt. Eine unspezifisch-reaktive Hepatitis wird auch als sogenannte „Begleithepatitis“ bezeichnet und beschreibt geringgradige entzündliche Reaktionen der Leber bei primär extrahepatischen Ursachen (DANCYGIER et al., 2003). Sie ist meist eine Reaktion auf systemische unspezifische entzündliche Prozesse, fieberige Allgemeinerkrankungen oder Entzündungen der inneren Organe (JAIN und KAKAR, 2011).

Die bei vier Tieren (Tier 73, 74, 31 und 71) festgestellte, multifokale Erythrophagozytose durch Kupffer-Zellen hat ihren Grund vermutlich sowohl in der direkten Interaktion von Erreger und Wirtszelle wie auch in der Bildung von Autoantikörpern gegen Erythrozyten. Es ist bekannt, dass mit *M. suis* infizierte sowie durch Antikörper opsonierte Erythrozyten durch Zellen des retikuloendothelialen Systems vorzeitig aus der Blutbahn entfernt werden (HOELZLE et al., 2014). Auch in den Lymphknoten sowie im Knochenmark zeigte sich bei sechs von sieben Tieren (Tier 76, 32, 73, 74, 31 und 71) eine gesteigerte Erythrophagozytose in den Makrophagen. Bei zwei Tieren (Tier 23 und 32) fand sich in den Makrophagen der Leber das Pigment Hämosiderin, ein Abbauprodukt des Hämoglobins. Die Hämosiderose der Kupffer-Zellen wird in der Literatur wiederholt beschrieben (CLAXTON und KUNESH, 1975; HOFFMANN et al., 1981; THIEL, 1983) und ist ein typischer Befund bei hämolytischen Anämien (KÄUFER-WEISS, 2007; SCHOON et al., 2011). Die Hämosiderose der Makrophagen konnte auch in den Lymphknoten und im Knochenmark nachgewiesen werden. Zusätzlich fand sich im aktivierten Knochenmark eine gesteigerte Erythrozytopoese als Zeichen der Regeneration.

Ein besonders auffälliger und gehäuft auftretender Befund in der histopathologischen Untersuchung der Organe der Tiere aus Gruppe I war der Hinweis auf Störungen der Blutgerinnung. Bei mehreren Tieren konnten vor allem in den Gefäßen der Lunge sowie in den Sinus verschiedener Lymphknoten sowohl fibrinarme als auch fibrinhaltige Gerinnsel nachgewiesen werden. Bei Tier 73 ließ sich in der *V. cava* zudem ein fokaler Endothelzellverlust mit Thrombusbildung, muraler Fibrininsudation, gemischtzelligen Infiltraten und einer akuten Blutung feststellen.

Laut PLANK und HEINRITZI (1990) kommt es während einer akuten IAP zu einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC). Sie untersuchten verschiedene Gerinnungsparameter bei experimentell mit *M. suis* infizierten Schweinen zum Zeitpunkt einer akuten IAP. Für die Aktivierung der intravasalen Gerinnungsprozesse im Zusammenhang mit einer akuten IAP kommen verschiedene Mechanismen in Frage.

Während einer akuten IAP kommt es zur Bildung von IgG-Autoantikörpern gegen wirtseigene Erythrozyten (HOELZLE et al., 2006). Zirkulierende Antigen-Antikörper-Komplexe können sich in den Gefäßwänden von Zielorganen wie z. B. der Haut ablagern und dort zu einer Aktivierung des Komplementsystems führen (HEWICKER-TRAUTWEIN und BEINEKE, 2011). Diese verursacht sowohl eine Thrombozytenaggregation unter Bildung von Mikrothromben, als auch die Aktivierung der Gerinnungskaskade über den Hageman-Faktor (HEWICKER-TRAUTWEIN und BEINEKE, 2011).

FELDER und Mitarbeiter (2011) konnten während der akuten IAP eine vermehrte Eryptose nachweisen. Die Eryptose führt zu Konformitätsänderungen der Erythrozytenmembran und zur Exposition von Phosphatidylserin, einem Bestandteil der Phospholipidmembran, auf der Oberfläche geschädigter Erythrozyten (FELDER et al., 2011). Phosphatidylserin stellt einen wichtigen Faktor bei der Bildung von Erythrozytenagglomeraten sowie der Adhäsion von Erythrozyten an die Zellen des Gefäßendothels dar (NGUYEN, 2010). Zusätzlich sind Phospholipidmembranen wichtige Komponenten im Gerinnungsprozess. An ihrer Oberfläche können sich die Proenzyme und Katalysatoren der Gerinnungskaskade anreichern und es kommt unter Einfluss von Ca^{2+} -Ionen zur Bindung von Gerinnungsfaktoren (MISCHKE, 2013).

Auch eine gesteigerte Fibrinogensynthese der Leber kommt als auslösender Faktor für eine vermehrte Gerinnungsneigung während der akuten IAP in Frage. Diese erfolgt zum Beispiel bei Entzündungsprozessen oder Gewebenekrosen in der Leber (SCHOON et al., 2011). Bei drei der sieben Tiere (Tier 23, 71 und 76) konnte in der histopathologischen Untersuchung eine geringgradige unspezifische reaktive interstitielle Hepatitis festgestellt werden, bei Tier 73 und 74 kam es zu Leberzellnekrosen. Fibrinogen wird im letzten Schritt der Gerinnungskaskade durch Thrombin zu Fibrin aktiviert (SCHOON et al., 2011).

Durch die Zerstörung von Blut- und Gewebezellen kann es ebenfalls zu einer Aktivierung der intravasalen Gerinnung kommen. Während einer akuten IAP werden Erythrozyten und Endothelzellen aufgrund verschiedener Mechanismen geschädigt.

Die direkte Interaktion von *M. suis* mit seiner Wirtszelle Erythrozyt führt zu deren unmittelbaren, intravasalen Zerstörung (HOELZLE et al., 2014). Zusätzlich kommt es durch die Bildung von autoreaktiven Antikörpern zu einer indirekten, immunmedierten intravasalen Lyse (HOELZLE et al., 2014). Bei der Lyse von Erythrozyten werden unter anderem Adenosindiphosphat (ADP) und Gewebethromboplastin freigesetzt. ADP induziert die Thrombozytenaktivierung und -aggregation. Aktivierte Thrombozyten wiederum sezernieren gerinnungsfördernde Faktoren (PLANK und HEINRITZI, 1990; MISCHKE, 2013). Gewebethromboplastin, ein in vielen Gewebe- und Blutzellen enthaltener Protein-Phospholipid-Komplex, ist der Ausgangspunkt der Enzymkaskade des extrinsischen Gerinnungssystems, an deren Ende die Bildung von Fibrinnetzen im Gefäßlumen steht (MISCHKE, 2013; GASSMANN und LUTZ, 2015). Neben der Lyse von Blutzellen, ist vor allem auch die Schädigung von Endothelzellen ein wichtiger Faktor bei der Freisetzung von Thromboplastin (SCHOON et al., 2011). Zu einer indirekten Schädigung von Endothelzellen könnte es aufgrund der zum Zeitpunkt der akuten IAP vorliegenden Hypoxidose durch die hochgradige Anämie sowie die von PETERANDERL (1988) festgestellte Blutazidose kommen. Auch die Ablagerung von Antigen-Antikörper-Komplexen in Gefäßen kann über die Aktivierung des Komplementsystems zu einer Schädigung der Gefäßwand beitragen (HEWICKER-TRAUTWEIN und BEINEKE, 2011). In den Untersuchungen von SOKOLI und Mitarbeiter (2013) konnte zusätzlich eine direkte Interaktion von *M. suis* mit Gefäßendothelzellen infizierter Tiere

nachgewiesen werden. Die daraus resultierenden strukturellen Veränderungen der Endothelzellen könnten ebenfalls zu einer Freisetzung von Thromboplastin und somit zur Gerinnungsaktivierung führen. In den nach Giemsa gefärbten Kunststoffschnitten der Tiere 23 und 32 sowie in der Immunhistochemie der Leber von Tier 23 konnte *M. suis* allerdings ausschließlich in Assoziation zu Erythrozyten und nicht zu Endothelzellen nachgewiesen werden.

Eine weitere, regelmäßig auftretende histopathologische Veränderung war die Dilatation der Lymphgefäße (Lymphangiektasie) in diversen Organen als Hinweis auf eine Permeabilitätsstörung mit Bildung von Ödemen. Bei vier der sieben Tiere (Tier 31, 73, 74 und 76) konnte ein mittelgradiges alveoläres und interstitielles Lungenödem festgestellt werden. Bei drei Tieren (Tier 23, 74 und 71) bestand ein gering- bis hochgradiges Gallenblasenbettödem. Bei Tier 76 konnten multifokal geringgradige akute Blutungen in der Leptomeninx sowie ein Ödem festgestellt werden. Auch hier wäre die indirekte oder direkte Schädigung des Endothels eine mögliche Erklärung für die gesteigerte Permeabilität der Gefäße und den Austritt von Flüssigkeit ins umliegende Gewebe. Auch könnte ein Zusammenhang mit den beschriebenen Störungen der Blutgerinnung vorliegen. Regionale venöse Abflussstörungen sind ein Faktor bei der Bildung von Ödemen und treten entweder durch äußere Obstruktionen oder innere Verlegungen (Thrombosierung) der Venen auf (SCHOON et al., 2011). In den Gefäßen der Lunge fanden sich Gefäßthromben, fibrinarme und fibrinhaltige Gerinnsel sowie hyaline Kügelchen. Auch in der Leber von vier Tieren (Tier 71, 73, 74 und 76) konnten als Gerinnungsprodukt auftretende hyaline Kügelchen in Sinusoiden und Gefäßen nachgewiesen werden. Die Sinusoide der Leber von Tier 74 waren hochgradig komprimiert, dies könnte eine Erklärung für das hochgradige Gallenblasenbettödem sowie den Aszites sein.

2. Verteilungsmuster von *M. suis* in den Organen

Von *M. suis* und anderen Hämoplasmen ist bekannt, dass die starke Adaptation an die Wirtszelle Erythrozyt von entscheidender Bedeutung für das Überleben und die Vermehrung des Erregers sowie seine Pathogenität im Wirt ist (HOELZLE, 2008). Aufgrund der bekannten Chronizität von Hämoplasmen-Infektionen und dem Unvermögen, die Erreger durch antibiotische Therapie wirkungsvoll zu eliminieren, vermuten verschiedene Autoren, dass eine Sequestration der Erreger

im Gewebe vorliegen könnte (TASKER et al., 2009; PETERS et al., 2011; WOLF-JACKEL et al., 2012; NOVACCO et al., 2013). In einer neueren Untersuchung mit dem hochinvasiven *M. suis*-Isolat KI3806 konnten nun erstmals Endothelzellen der Blutgefäße infizierter Tiere als weitere Wirtszelle von *M. suis* identifiziert werden (SOKOLI et al., 2013).

In der vorliegenden Arbeit sollte daher das Verteilungsmuster von *M. suis* im Körper sowie innerhalb verschiedener Organe hinsichtlich potentieller weiterer Wirtszellen und einer damit verbundenen Sequestration in Organen evaluiert werden. Zu diesem Zweck wurden Gewebeproben von Leber, Lunge, Nieren, Gehirn, Lymphknoten und Knochenmark der Tiere aus Gruppe I mittels einer *M. suis*-spezifischen, quantitativen PCR untersucht und die Ergebnisse mit der erwarteten Erregermenge im Organ verglichen. In die Berechnung flossen die Erregermenge im Blut zum Zeitpunkt der Euthanasie sowie das erwartete Blutvolumen im jeweiligen Organ mit ein (Berechnung nach TASKER und Mitarbeiter (2009)). Mittels *M. suis*-spezifischer, quantitativer PCR konnte in allen untersuchten Gewebeproben *M. suis*-DNA nachgewiesen werden. Die Berechnung der erwarteten Erregermenge erfolgte nur für die Organe Leber, Lunge, Nieren und Gehirn, da nur für diese auch Angaben zur Durchblutungsrate vorhanden waren.

Es zeigte sich bei allen Tieren in den Nieren eine deutlich höhere Erregermenge als durch die Blutversorgung allein zu erwarten war. Allerdings fand sich bei der mikroskopischen Untersuchung der nach Giemsa gefärbten Kunststoffschnitte kein Hinweis auf eine Assoziation von *M. suis* zu anderen Zellen als den in den Blutgefäßen der Niere enthaltenen Erythrozyten. In einer Untersuchung von (DIETZ et al., 2014) zum Ausscheidungsverhalten von *M. suis* konnte *M. suis*-DNA im Urin infizierter Tiere nachgewiesen werden. Eventuell könnten in der PCR auch Erreger bzw. Erregerbestandteile erfasst werden, die sich in Urinrückständen in den Nierenproben befanden. Für die PCR wurde eine Mischprobe aus Mark- und Rindenbereichen beider Nieren verwendet. Andererseits könnte, da sich in der Berechnung bei allen Tieren eine niedrigere Erregermenge als in der PCR ermittelt ergab, auch ein Fehler in der Berechnung der erwarteten Erregermenge vorliegen. Es gibt bisher keine erprobte Methode zum Vergleich von Erregermengen im Blut und in Geweben (TASKER et al., 2009). Die Angaben zur Durchblutungsrate der Organe entstammen einem Physiologiebuch für Haustiere und sind nicht speziell für das Schwein angegeben (V. ENGELHARDT, 2000). Daher könnte es sein, dass

die Blutversorgung und somit die erwartete Erregermenge der Nieren unterschätzt wurde.

In der Leber konnte bei einem von sieben Tieren (Tier 31) in der PCR eine höhere Erregermenge nachgewiesen werden als zu erwarten war, im Gehirn bei zwei von sieben Tieren (Tier 31 und 76) und in der Lunge ebenfalls bei zwei von sieben Tieren (Tier 31 und 71). Wiederum konnte in den nach Giemsa gefärbten Kunststoffschnitten der Organe der Erreger ausschließlich Erythrozyten-assoziiert dargestellt werden. Auch aus den Befunden der pathologischen und histopathologischen Untersuchung der betroffenen Tiere lässt sich keine eindeutige Erklärung für eine höhere Erregermenge in den jeweiligen Organen ableiten.

Insgesamt konnte nur bei zwei von sieben Tieren *M. suis* in den nach Giemsa gefärbten Kunststoffschnitten nachgewiesen werden, obwohl alle Tiere zum Zeitpunkt der Probenentnahme eine Erregermenge von $6,33 \times 10^4$ bis $4,79 \times 10^7$ *M. suis*/ml Blut aufwiesen. Dies könnte an der relativ geringen Sensitivität von mikroskopischen Erregernachweisen allgemein liegen. PETERS und Mitarbeiter (2011) geben eine Erregermenge von mindestens 10^6 Erreger/ml Blut als Nachweisgrenze für *M. haemofelis* in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an. Ein mikroskopischer Erregernachweis ist immer angewiesen auf die Präsenz einer ausreichend hohen Anzahl von Erregern in dem kleinen, für die Untersuchung genutzten Organausschnitt. Der Erregernachweis erfolgte immer Erythrozyten-assoziiert in Gefäßen, Lebersinusoiden und im Knochenmark. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Untersuchungen mittels In-situ-Hybridisierung sowohl zu *M. suis* als auch zu der feline Hämoplasmenart *M. haemofelis*. Dort konnten Erreger ebenfalls ausschließlich in Verbindung mit Erythrozyten in den verschiedenen Organen nachgewiesen werden (HA et al., 2005; PETERS et al., 2011).

3. Übertragung von *M. suis* durch die orale Aufnahme erregerhaltigen Blutes

Die Übertragung von *M. suis* erfolgt nach heutigem Wissensstand vorwiegend hämatogen von Tier zu Tier. Sie findet vorwiegend iatrogen im Rahmen von zootechnischen Maßnahmen oder durch verunreinigte Kanülen, aber auch durch kleinere Verletzungen und Rangkämpfe sowie blutsaugende Arthropoden statt (HENRY, 1979; HEINRITZI, 1992; PRULLAGE et al., 1993). In der Literatur ist zudem auch die Möglichkeit der intrauterinen Übertragung von der Sau auf ihre

Ferkel beschrieben (BERRIER und GOUGE, 1954; PRESTON und GREVE, 1965; CLAXTON und KUNESH, 1975; HENDERSON et al., 1997). HEINRITZI (1990a) konnte in seinen Untersuchungen zur Übertragbarkeit von *M. suis* eine Infektion durch die orale Aufnahme von Blut und bluthaltigem Urin nachweisen. Daneben werden weitere, blutunabhängige Übertragungswege diskutiert (DIETZ et al., 2014). In neueren Untersuchungen über das Ausscheidungsverhalten von *M. suis* konnte mittels quantitativer PCR *M. suis*-DNA in Urin, Speichel, Nasen- und Vaginalsekret experimentell infizierter Tiere, welche keine Blutbestandteile enthielten, nachgewiesen werden (DIETZ et al., 2014). Auch in den untersuchten Umgebungsproben sowie dem Trinkwasser der Tiere konnte mittels PCR *M. suis*-DNA nachgewiesen werden.

Die vorliegende Studie stellt die erste Untersuchung zur Übertragbarkeit von *M. suis* durch die orale Aufnahme von erregershaltigem Blut seit der Einführung hoch sensibler molekularer Diagnostikmethoden dar. Dies ermöglicht erstmals eine genaue Bestimmung des Erregers Stammes und der Infektionsdosis sowie eine umfassende Analyse des Infektionsverlaufs. In bisher durchgeführten Untersuchungen zur oralen Übertragbarkeit von *M. suis* erfolgte der Erregernachweis ausschließlich mikroskopisch (HEINRITZI, 1992). Der mikroskopische Erregernachweis zeichnet sich durch eine niedrige Spezifität und Sensitivität aus, eine sichere Diagnose ist erst ab einer hohen Erregeranzahl im Blut (10^6 *M. suis*/ml Blut) möglich (RITZMANN et al., 2009).

In der vorliegenden Untersuchung konnte eine Übertragbarkeit von *M. suis* durch die orale Aufnahme von erregershaltigem Blut nicht nachgewiesen werden. Bei den Tieren der Versuchsgruppe II konnten nach der oralen Inokulation über den Versuchszeitraum von 90 Tagen weder klinische Anzeichen einer *M. suis*-Infektion festgestellt werden, noch gelang der Erregernachweis von *M. suis* im Blut mittels PCR. Auch die hämatologischen und klinisch-chemischen Blutparameter gaben keinen Hinweis auf eine Infektion mit *M. suis*. Der nachgewiesene Abfall der mittleren Erythrozytenzahl und des mittleren Hämatokrits auf Werte unterhalb des Referenzbereiches ab Tag 2 p. i. könnte auf den Blutverlust infolge der sieben Tage *prae infectionem* durchgeführten Splenektomie und dem daraus resultierenden Fehlen der Milz als Speicherort der Erythrozyten zurückzuführen sein. Laut KRAFT und Mitarbeiter (2013a) benötigt der Erythrozytenersatz Wochen, was erklären könnte, warum die Mittelwerte der Erythrozytenzahl und des Hämatokrits

erst ab Tag 42 p. i. wieder innerhalb des Referenzbereiches lagen.

Im Gegensatz zu der Untersuchung von HEINRITZI (1990a), der durch die orale Eingabe von 10 ml erregerehaltigen Blutes bei fünf splenektomierten Mastläufern eine akute *M. suis*-Infektion induzieren konnte, wurden in der vorliegenden Studie nur 1,5 ml *M. suis*-haltigen Blutes je Versuchstier verabreicht. Diese Anpassung erfolgte aufgrund der Annahme, dass die Aufnahme von 10 ml infizierten Blutes durch Verhaltensweisen wie das Belecken von Wunden oder gegenseitiges Beknabbern eher unwahrscheinlich erscheint. Die von HEINRITZI (1990a) verwendete Infektionsdosis lag mit Werten zwischen $5,8 \times 10^9$ und $4,17 \times 10^{10}$ *M. suis*/10 ml Blut deutlich höher als die hier verwendete Infektionsdosis von $3,0 \times 10^7$ *M. suis*/1,5 ml Blut. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass es in der vorliegenden Studie nicht gelang, die Tiere der Gruppe II mit *M. suis* zu infizieren. Darüber hinaus könnte der für die Infektion verwendete Feldstamm K323/13 eine niedrigere Virulenz aufweisen als der von HEINRITZI (1990a) verwendete, nicht näher definierte *M. suis*-Stamm. Laut HEINRITZI (1990a) ist die Virulenz des Erregerstammes entscheidend für die orale Übertragung von *M. suis*. Nach parenteraler Infektion mit demselben Erregerisolat und derselben Infektionsdosis zeigten die Tiere der Gruppe I deutliche klinische Anzeichen einer *M. suis*-Infektion sowie hohe Erregermengen im Blut von bis zu $4,8 \times 10^7$ *M. suis*/ml Blut. Bei Untersuchungen mit dem hochvirulenten *M. suis*-Isolat KI3806 konnten bei splenektomierten, parenteral infizierten Tieren jedoch deutlich höhere Erregermengen von bis zu $1,61 \times 10^{10}$ *M. suis*/ml Blut gemessen werden. Zusätzlich kam es nach Infektion mit dem hochvirulenten Erregerisolat zu einem foudroyanten Infektionsverlauf, bei dem keines der sieben Tiere die Infektion länger als 8 Tage überlebte (STADLER et al., 2014). Daher ist bei dem Feldstamm K323/13 von einer niedrigeren Virulenz im Vergleich zu den hochvirulenten *M. suis*-Isolaten auszugehen.

Basierend auf neueren, PCR-basierten Untersuchungen des Ausscheidungsverhaltens von *M. suis* werden aktuell blutunabhängige Übertragungswege von *M. suis* diskutiert. DIETZ und Mitarbeiter (2014) konnten im nicht bluthaltigen Urin sowie in Speichel-, Nasen- und Vaginaltupfern von experimentell mit dem hochvirulenten *M. suis*-Isolat KI3806 infizierten Tieren *M. suis*-DNA nachweisen. Dabei wurden Bakterienmengen von bis zu $6,3 \times 10^5$ *M. suis*/ml Urin und $2,7 \times 10^5$ *M. suis*/Tupfer festgestellt. Zu einer

Ausscheidung kam es ab einer Erregermenge im Blut von $5,0 \times 10^6$ *M. suis*/ml Blut. Ausgehend von diesen Untersuchungen und der Tatsache, dass im Feld Bakterienmengen von bis zu $7,62 \times 10^7$ *M. suis*/ml Blut festgestellt werden können (RITZMANN et al., 2009), stellten DIETZ und Mitarbeiter (2014) die Hypothese auf, dass das Trinken von Urin oder die normale soziale Interaktion zwischen einzelnen Tieren für eine Übertragung von *M. suis* ausreichend und somit mitverantwortlich für die Zirkulation der Infektion innerhalb einer Schweineherde sein könnte. GLONEGGER-REICHERT (2015) konnte in Untersuchungen zum Ausscheidungsverhalten des, auch in der hier vorliegenden Studie verwendeten, *M. suis*-Feldstammes K323/13 keine Ausscheidung über nicht bluthaltigen Urin, Speichel und Vaginalsekret nachweisen. Im Gegensatz zu DIETZ und Mitarbeiter (2014) gelang ein Nachweis von *M. suis*-DNA im Urin bei GLONEGGER-REICHERT (2015) nur zu Zeitpunkten, zu denen auch Blutbestandteile im Urin nachgewiesen werden konnten. Zusätzlich konnte einmalig bei einem Tier im Nasentupfer eine Erregermenge von $1,1 \times 10^4$ *M. suis*/Tupfer nachgewiesen werden.

Die unterschiedlichen Ergebnisse von GLONEGGER-REICHERT (2015) und DIETZ und Mitarbeiter (2014) deuten darauf hin, dass die Ausscheidungswege von *M. suis* je nach Erregerisolat variieren können und der Ausscheidung des Erregers über Se- und Exkrete nicht zwingend eine Rolle in der Infektionsdynamik zukommt. Hinzu kommt, dass bislang keine Aussage über die Infektiösität *M. suis*-haltiger Se- und Exkrete getroffen werden kann. In dem hier vorliegenden Infektionsversuch wurde als Grundlage für weitere Untersuchungen hinsichtlich der Übertragbarkeit von *M. suis* durch die orale Aufnahme erregerrhaltigen Materials infektiöses Blut als Inokulum gewählt. Da eine Übertragung des *M. suis*-Feldstammes K323/13 durch die orale Eingabe von 1,5 ml Blut mit einer Infektionsdosis von $2,0 \times 10^7$ *M. suis*/ml Blut zu keiner Infektion beim Empfängertier führte, erscheint eine Übertragung nur durch das Belecken von Wunden oder das Trinken von bluthaltigem Urin unwahrscheinlich. Zu der Übertragbarkeit hochvirulenter Erregerisolate sowie eine Übertragung durch die Aufnahme nicht bluthaltiger Se- und Exkrete kann auf Basis dieser Untersuchung aber keine Aussage getroffen werden.

Eine Untersuchung zur Transmission von *Candidatus Mycoplasma turicensis* (CMt), eines bei der Katze vorkommenden hämotrophen Bakteriums, kam zu

ähnlichen Ergebnissen (MUSEUX et al., 2009). Dort wurde naiven Katzen entweder Blut mit bis zu 4×10^5 CMt/ml oral oder Speichel mit bis zu 6×10^3 CMt/ml oronasal eingegeben. Dabei wurde ein Volumen von 500 μ l eingegebenen Inokulums nicht überschritten, um einen möglichst natürlichen Prozess darzustellen. Auch in dieser Untersuchung konnte eine Übertragung des Erregers durch die orale Aufnahme von Blut oder Speichel infizierter Katzen nicht nachgewiesen werden. MUSEUX und Mitarbeiter (2009) kommen daher ebenfalls zu dem Schluss, dass bei normalem Sozialverhalten von Katzen wie dem gegenseitigen Belecken keine Gefahr für eine Übertragung des Erregers besteht. Bei aggressiven Interaktionen (z. B. einem Biss) schließen sie eine Übertragung vom Aggressor auf das gebissene Tier aber nicht aus, da dies einer subkutanen Infektion entspräche.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Mycoplasma suis gehört zur Gruppe der hämotrophen Mykoplasmen und ist das ätiologische Agens der infektiösen Anämie der Schweine (IAP). Durch die Etablierung neuer molekularer Technologien konnten in den letzten Jahren neue Einblicke in die Adhäsions- und Invasionsvorgänge, die Ausscheidungswege, den Zelltropismus und die Immunopathologie von *M. suis* gewonnen werden (HOELZLE, 2008; SOKOLI et al., 2013; DIETZ et al., 2014; HOELZLE et al., 2014).

In der vorliegenden Studie wurde anhand von sieben Tieren der Verlauf einer experimentellen Infektion splenektomierter Schweine nach subkutaner Applikation des *M. suis*-Feldstammes K323/13 hinsichtlich der klinischen und labordiagnostischen Veränderungen untersucht. Es erfolgte die Detektion und Quantifizierung der *M. suis*-DNA im Blut sowie in Gewebeproben von Leber, Lunge, Niere, Gehirn, Lymphknoten und Knochenmark mittels quantitativer MSG1-PCR. Zusätzlich wurde eine pathologisch-anatomische und histopathologische Untersuchung durchgeführt und der Erreger mittels nach Giemsa gefärbten Kunststoffschnitten und Immunhistochemie im Gewebe nachgewiesen. Um mögliche neue Übertragungswege zu evaluieren, wurde bei sieben Tieren die Möglichkeit der Übertragung von *M. suis* durch die orale Aufnahme erregerrhaltigen Blutes untersucht.

Bei der klinischen Untersuchung der subkutan infizierten Tiere zeigten sich widerkehrende, akute Anfälle mit Iktereanämie, hohem Fieber, Apathie und Anorexie. Zusätzlich traten Manifestationen der Haut wie *Morbus maculosus*, Zyanosen und Ekchymosen auf. Labordiagnostisch ließen sich eine hochgradige Hypoglykämie sowie ein Anstieg des Bilirubins, des Harnstoffs und der Enzymaktivität von AP, AST und CK feststellen. In der histopathologischen Untersuchung dominierten die Hinweise auf Störungen der Blutgerinnung und auf Permeabilitätsstörungen mit Bildung von Ödemen. Bei mehreren Tieren zeigte sich eine geringgradige unspezifische reaktive interstitielle Hepatitis, bei Einzeltieren auch Leberzelldegenerationen. In den nach Giemsa gefärbten Kunststoffschnitten sowie der Immunhistochemie konnte *M. suis* ausschließlich Erythrozyten-assoziiert nachgewiesen werden. Es ergab sich kein Hinweis auf potentielle weitere

Wirtszellen oder eine Sequestration des Erregers in Organen.

Die splenektomierten, oral mit *M. suis* infizierten Tiere zeigten über den Versuchszeitraum von 90 Tagen weder klinische Anzeichen einer IAP noch labordiagnostische Veränderungen, die auf eine akute IAP hindeuten würden. In der *M. suis*-spezifischen, quantitativen PCR konnte zu keinem Zeitpunkt *M. suis*-DNA nachgewiesen werden. Somit konnte die Möglichkeit der oralen Übertragung von *M. suis* durch die Aufnahme erregerehaltigen Blutes in dieser Studie nicht bestätigt werden.

VII. SUMMARY

Mycoplasma suis belongs to the group of haemotrophic mycoplasmas and is the ethiological agent of the infectious anemia in pigs (IAP). In the last few years, valuable insights into the mechanisms of adhesion and invasion, the shedding-patterns, cell tropism and immunopathology of *M. suis* were gained by the use of new, molecular techniques (HOELZLE, 2008; SOKOLI et al., 2013; DIETZ et al., 2014; HOELZLE et al., 2014).

In this study, seven splenectomized pigs were experimentally infected with *M. suis*-strain K323/13 by subcutaneous application and the clinical course and laboratory findings were investigated. Detection and quantification of *M. suis*-DNA in blood and tissue samples of liver, lung, kidney, brain, lymph nodes and bone marrow were performed using the quantitative MSG1-PCR. At necropsy, a pathological-anatomical and histopathological examination was conducted. *M. suis* was detected in the tissue samples using Giemsa-stained plastic cuts and immunohistochemistry.

In order to evaluate potential new routes of transmission of *M. suis*, seven splenectomized pigs were infected orally with *M. suis*-containing blood.

Clinical examination of the splenectomized, subcutaneously infected pigs revealed periodical clinical signs of acute IAP including severe icteroaemia, high fever, apathy and anorexia. In addition, dermatological manifestations like *Morbus maculosus*, cyanosis and ecchymosis occurred. The most important laboratory alterations were severe hypoglycemia, as well as an increase of bilirubin, urea and the activity of AP, AST and CK. Histopathological examination predominantly demonstrated signs of blood coagulation disorder and an increased permeability of blood vessels causing edema. Several pigs showed an unspecific, reactive, interstitial hepatitis. In addition, the liver of two animals showed a degeneration of liver cells. *M. suis* could be exclusively detected associated to erythrocytes in the tissue samples by the analysis of Giemsa-stained plastic cuts and immunohistochemistry. There were no signs of sequestration of *M. suis* in tissues or any other host cell than red blood cells.

The splenectomized, orally infected animals never showed any clinical or laboratory signs of *M. suis*-infection during the trial period of 90 days. Additionally, *M. suis*-DNA could not be detected in the blood by *M. suis*-specific PCR at the

investigated time points. In conclusion, the results of the present study indicate that oral intake of *M. suis* containing blood plays a negligible role in transmission of *M.suis*

VIII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Phylogenetische Eingruppierung von M. suis und M. parvum basierend auf 16S rRNA-Gensequenzen (Kube und Hoelzle, unpublished).</i>	5
<i>Abbildung 2: Rasterelektronenmikroskopische und transmissions-elektronenmikroskopische Darstellung von M. suis auf den Erythrozyten</i>	6
<i>Abbildung 3: Zeitlicher Versuchsablauf</i>	30
<i>Abbildung 4: Schema der Ruhedurchblutung der Organe. Die Prozentzahlen geben den Anteil des Herzminutenvolumens an, der durch die jeweiligen Organgebiete fließt (V. ENGELHARDT, 2000).</i>	36
<i>Abbildung 5: Hochgradige Ohrtrandzyanosen bei Tier 32</i>	43
<i>Abbildung 6: Morbus maculosus bei Tier 23 an Tag 7 p.i.</i>	44
<i>Abbildung 7: Ekchymosen am Ohr von Tier 73</i>	45
<i>Abbildung 8: Verlauf des klinischen Gesamtscores über 41 Tage von Tier 31</i>	46
<i>Abbildung 9: Verlauf der Körperinnentemperatur über 62 Tage von Tier 71</i>	46
<i>Abbildung 10: Erregermenge im Blut der Tiere aus Gruppe I im zeitlichen Verlauf, geordnet nach der Überlebenszeit in Tagen.</i>	49
<i>Abbildung 11: Verlauf der hämatologischen Parameter Erythrozytenzahl, Hämoglobin und Hämatokrit der Gruppe I über den Untersuchungszeitraum. Die gestrichelten Linien markieren die Referenzbereiche nach NERBAS (2008).</i>	52
<i>Abbildung 12: Mikroagglutination an Tag 21 p. i. bei Tier 31</i>	52
<i>Abbildung 13: Leukozytenzahl der Gruppe I über den Untersuchungszeitraum. Die gestrichelten Linien markieren den Referenzbereich nach NERBAS (2008).</i>	53
<i>Abbildung 14: Verlauf und Standardabweichung der Mittelwerte der hämatologische Parameter Erythrozytenzahl, Hämoglobin und Hämatokrit der Gruppe II über den Versuchszeitraum von 90 Tagen. Die gestrichelten Linien markieren die Referenzbereiche nach NERBAS (2008).</i>	55
<i>Abbildung 15: Verlauf und Standardabweichungen der mittleren Leukozytenzahl im Blut der splenektomierten, oral infizierten Tiere. Die gestrichelten Linien markieren den Referenzbereich nach NERBAS (2008).</i>	55
<i>Abbildung 16: Verlaufskurven der klinisch-chemischen Blutparameter Gesamtbilirubin, direktes Bilirubin und indirektes Bilirubin über den Untersuchungszeitraum. Die gestrichelten Linien markieren die Referenzbereiche nach NERBAS (2008).</i>	57

<i>Abbildung 17: Verlaufskurve der Blutglukosekonzentration der Gruppe I über den Untersuchungszeitraum. Die gestrichelten Linien markieren den Referenzbereich nach NERBAS (2008).....</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 18: Verlaufskurven der Harnstoffkonzentration der Gruppe I über den Untersuchungszeitraum. Die gestrichelten Linien markieren den Referenzbereich nach NERBAS (2008).....</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 19: Verlaufskurven der Eisenkonzentration der Gruppe I über den Untersuchungszeitraum. Die gestrichelten Linien markieren den Referenzbereich nach NERBAS (2008).....</i>	<i>60</i>
<i>Abbildung 20: Verlauf der Enzyme γ-GT und AP der Gruppe I. Die gestrichelten Linien markieren die Referenzbereiche nach NERBAS (2008).....</i>	<i>61</i>
<i>Abbildung 21: Verlauf der Enzyme AST und CK der Gruppe I. Die gestrichelten Linien markieren die Referenzbereiche nach NERBAS (2008).....</i>	<i>62</i>
<i>Abbildung 22: Mittelwerte und Standardabweichungen der klinisch-chemischen Parameter Gesamtbilirubin und direktes Bilirubin der Gruppe II im Versuchszeitraum von 90 Tagen. Die gestrichelten Linien markieren die Referenzbereiche nach NERBAS (2008).....</i>	<i>63</i>
<i>Abbildung 23: Mittelwerte und Standardabweichungen der klinisch-chemischen Parameter Blutglukose, Harnstoff und Eisen der Gruppe II im Versuchszeitraum von 90 Tagen. Die gestrichelten Linien markieren die Referenzbereiche nach NERBAS (2008).....</i>	<i>65</i>
<i>Abbildung 24: Verlaufskurve der Mittelwerte und Standardabweichungen des Enzyms γ-GT (Gamma-Glutamyl-Transferase) im Serum der Gruppe II über den Versuchszeitraum von 90 Tagen. Die gestrichelten Linien markieren den Referenzbereich nach NERBAS (2008).....</i>	<i>65</i>
<i>Abbildung 25: Gelbfärbung der Gefäßwand der Aorta bei Tier 74</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 26: Wässrig-durchscheinende, ikterisch verfärbte Flüssigkeit aus der Bauchhöhle von Tier 74</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 27: Landkartenartige gelbliche Herde in der Leber von Tier 73</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 28: Ungleichmäßig verteilte, beige Herde und Ikterus in der Leber von Tier 74</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 29: Hochgradiges Gallenblasenbettödem und Ikterus bei Tier 74</i>	<i>69</i>
<i>Abbildung 30: Veränderungen der Leber bei experimentell mit <i>M. suis</i> infizierten Schweinen.....</i>	<i>70</i>
<i>Abbildung 31: Veränderungen der Leber bei experimentell mit <i>M. suis</i> infizierten</i>	

<i>Schweinen.....</i>	<i>71</i>
<i>Abbildung 32: Veränderungen der Lunge bei experimentell mit M. suis infizierten Schweinen.....</i>	<i>72</i>
<i>Abbildung 33: Veränderungen an den Lymphgefäßen bei experimentell mit M. suis infizierten Schweinen.</i>	<i>73</i>
<i>Abbildung 34: Veränderungen des Knochenmarks bei experimentell mit M. suis infizierten Schweinen.</i>	<i>74</i>
<i>Abbildung 35: Die Montage zeigt die verschiedenen lichtmikroskopischen Nachweisverfahren für M. suis</i>	<i>78</i>
<i>Abbildung 36: Nachweis von M. suis auf Erythrozyten mit Hilfe von in Kunststoff eingebetteten Geweben in der Färbung nach Giemsa</i>	<i>79</i>
<i>Abbildung 37: Nachweis von M. suis in der Leber von Tier 23 mittels Immunhistochemie.....</i>	<i>80</i>

IX. TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Gewicht der Organe Leber, Lunge, Gehirn und Nieren in % des Körpergewichts</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 2: Erregermenge im Blut der splenektomierten, subkutan infizierten Tiere in den ersten 21 Tagen p. i.</i>	<i>48</i>
<i>Tabelle 3: Prozentualer Anteil des direkten und indirekten Bilirubins am Gesamtbilirubin zum Zeitpunkt der höchsten Bilirubinkonzentration im Blut je Tier</i>	<i>58</i>
<i>Tabelle 4: Darstellung des CK/AST-Quotienten der Gruppe I zum Zeitpunkt der jeweils maximalen AST-Konzentration im Serum</i>	<i>62</i>
<i>Tabelle 5: Erregermenge in Lunge, Leber, Niere, Gehirn, Knochenmark und Lymphknoten der Tiere aus Gruppe I</i>	<i>75</i>
<i>Tabelle 6: Zusammenfassung der Erregermenge in Blut und Organen.</i>	<i>77</i>
<i>Tabelle 7: Verwendete Geräte mit Herstellerangabe und Gerätetyp, sortiert nach ihrer Nummerierung im Material- und Methodenteil.</i>	<i>134</i>

X. LITERATURVERZEICHNIS

Ackerknecht E. Die Zentralorgane Rückenmark und Gehirn. In: Handbuch der vergleichenden Anatomie der Haustiere, 18 edn. Ellenberger W, Baum H, eds. Berlin: Springer-Verlag 1977a: 809-888.

Ackerknecht E. Das Eingeweidesystem. In: Handbuch der vergleichenden Anatomie der Haustiere, 18 edn. Ellenberger W, Baum H, eds. Berlin: Springer-Verlag 1977b: 331-580.

Bauer N, Neumann S. Skelettmuskulatur, Knochen, Kalzium-, Phosphor-, Magnesiumstoffwechsel. In: Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. Moritz A, ed. Stuttgart: Schattauer GmbH 2013: 319-334.

Berent LM, Messick JB, Cooper SK, Cusick PK. Specific in situ hybridization of *Haemobartonella felis* with a DNA probe and tyramide signal amplification. *Vet Pathol* 2000; 37: 47-53.

Berrier HH, Jr., Gouge RE. Eperythrozoonosis transmitted in utero from carrier sows to their pigs. *J Am Vet Med Assoc* 1954; 124: 98-100.

Bickhardt K. Muskelerkrankungen. In: Lehrbuch der Schweinekrankheiten. Waldmann K-H, Wendt M, eds. Berlin: Parey Buchverlag 2001: 239-259.

Braun K. Untersuchungen des Blutbildes sowie der Eisen- und Kupferkonzentration im Serum von Schweinen unter Kupfersulfat-Medikation, während der Eperythrozoonose und nach Eisendextran-Applikation. Diss. med. vet. 1985. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Brömel J, Zettl K. Die Eperythrozoonose-Ein Bildbericht mit Literaturübersicht. *Prakt Tierarzt* 1985; 9: 689-698.

Büttner M. Allgemeine Virologie. In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Mayr A, ed. Stuttgart: Enke Verlag 2007: 60-135.

Chandler HL, Colitz CM. Molecular biology for the clinician: understanding current methods. *J Am Anim Hosp Assoc* 2006; 42: 326-335.

Claxton M, Kunesch JP. Eperythrozoonosis in swine. *Iowa State Univ Vet* 1975; 37: 82-83.

Dancygier H, Frühauf H, Sarrazin C, Sarrazin U, Zeuzem S. Infektiöse Lebererkrankungen. In: *Klinische Hepatologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie hepatobiliärer Erkrankungen*. Dancygier H, ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag 2003: 398-516.

Dent BT, Stevens KA, Korvick DL, Clymer JW. *Mycoplasma suis* infection in pigs after splenectomy. *Lab Anim (NY)* 2013; 42: 125-128.

Dietz S, Mack SL, Hoelzle K, Becker K, Jannasch C, Stadler J, Ritzmann M, Hoelzle LE. Quantitative PCR analysis of *Mycoplasma suis* shedding patterns during experimental infection. *Vet Microbiol* 2014; 172: 581-585.

Dietz S, Lassek C, Mack SL, Ritzmann M, Stadler J, Becher D, Hoelzle K, Riedel K, Hoelzle LE. Updating the proteome of the uncultivable hemotrophic *Mycoplasma suis* in experimentally infected pigs. *Proteomics* 2016; 16: 609-613.

do Nascimento NC, dos Santos AP, Chu Y, Guimaraes AM, Baird AN, Weil AB, Messick JB. Microscopy and genomic analysis of *Mycoplasma parvum* strain Indiana. *Vet Res* 2014; 45: 86.

dos Santos AP, dos Santos RP, Biondo AW, Dora JM, Goldani LZ, de Oliveira ST, de Sa Guimaraes AM, Timenetsky J, de Moraes HA, Gonzalez FH, Messick JB. Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 1922-1924.

Doyle LP. A Rickettsia-like or anaplasmosis-like disease in swine. *J Am Vet Med Assoc* 1932; 81: 668-671.

Felder KM, Hoelzle K, Heinritzi K, Ritzmann M, Hoelzle LE. Antibodies to actin in autoimmune haemolytic anaemia. BMC Vet Res 2010; 6: 18.

Felder KM, Hoelzle K, Ritzmann M, Kilchling T, Schiele D, Heinritzi K, Groebel K, Hoelzle LE. Hemotrophic mycoplasmas induce programmed cell death in red blood cells. Cell Physiol Biochem 2011; 27: 557-564.

Felder KM, Carranza PM, Gehrig PM, Roschitzki B, Barkow-Oesterreicher S, Hoelzle K, Riedel K, Kube M, Hoelzle LE. Insights into the gene expression profile of uncultivable hemotrophic *Mycoplasma suis* during acute infection, obtained using proteome analysis. J Bacteriol 2012; 194: 1505-1514.

Fey K. Hämatopoetisches System. In: Handbuch Pferdepraxis. Dietz O, Huskamp B, eds. Stuttgart: Enke Verlag 2006: 273-295.

Fromm M, Hierholzer K. Niere. In: Physiologie der Haustiere. v. Engelhardt W, Breves G, eds. Stuttgart: Enke im Hippokrates Verlag GmbH 2000: 254-288.

Gassmann M, Lutz T. Blut. In: Physiologie der Haustiere. v. Engelhardt W, Breves G, Diener M, Gäbel G, eds. Stuttgart: Enke Verlag 2015: 216-240.

Glonegger-Reichert J. Klinischer Krankheitsverlauf der infektiösen Anämie der Schweine und Ausscheidungswege von *Mycoplasma suis* nach experimenteller Infektion splenektomierter Schweine mit dem Feldstamm K323/13. Diss. med. vet. 2015. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Groebel K, Hoelzle K, Wittenbrink MM, Ziegler U, Hoelzle LE. *Mycoplasma suis* invades porcine erythrocytes. Infect Immun 2009; 77: 576-584.

Guimaraes AM, Vieira RF, Poletto R, Vemulapalli R, Santos AP, de Moraes W, Cubas ZS, Santos LC, Marchant-Forde JN, Timenetsky J, Biondo AW, Messick JB. A quantitative TaqMan PCR assay for the detection of *Mycoplasma suis*. J Appl Microbiol 2011a; 111: 417-425.

Guimaraes AM, Santos AP, SanMiguel P, Walter T, Timenetsky J, Messick JB. Complete genome sequence of *Mycoplasma suis* and insights into its biology and adaption to an erythrocyte niche. PLoS One 2011b; 6: 19574.

Guimaraes AM, Santos AP, Timenetsky J, Bower LP, Strait E, Messick JB. Identification of *Mycoplasma suis* antigens and development of a multiplex microbead immunoassay. J Vet Diagn Invest 2014; 26: 203-212.

Gwaltney SM, Willard LH, Oberst RD. In situ hybridizations of *Eperythrozoon suis* visualized by electron microscopy. Vet Microbiol 1993a; 36: 99-112.

Gwaltney SM, Hays MP, Oberst RD. Detection of *Eperythrozoon suis* using the polymerase chain reaction. J Vet Diagn Invest 1993b; 5: 40-46.

Gwaltney SM, Oberst RD. Comparison of an improved polymerase chain reaction protocol and the indirect hemagglutination assay in the detection of *Eperythrozoon suis* infection. J Vet Diagn Invest 1994; 6: 321-325.

Ha SK, Jung K, Choi C, Ha Y, Song HC, Lim JH, Kim SH, Chae C. Development of in-situ hybridization for the detection of *Mycoplasma haemosuis* (*Eperythrozoon suis*) in formalin-fixed, paraffin wax-embedded tissues from experimentally infected splenectomized pigs. J Comp Pathol 2005; 133: 294-297.

Heinritzi K. Klinik, Hämatologie und Metabolismus des eperythrozoonotischen Anfalls. Prakt Tierarzt 1984a; 65: 40-44.

Heinritzi K. Ein Beitrag zur Splenektomie beim Schwein. Tierärztl Prax 1984b; 12: 451-454.

Heinritzi K. *Eperythrozoon*-Infektion beim Schwein als Faktorenkrankheit. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 1989; 102: 337-342.

Heinritzi K (1990a) Untersuchungen zur Pathogenese und Diagnostik der Infektion

mit *Eperythrozoon suis*, Habilitationsschrift. Ludwigs-Maximilians-Universität München, München

Heinritzi K, Plank G, Peteranderl W, Sandner N. Untersuchungen zum Säure-Basen-Haushalt und Kohlenhydratstoffwechsel bei der Infektion mit *Eperythrozoon suis*. Zentralbl Veterinärmed B 1990; 37: 412-417.

Heinritzi K. Zur Diagnostik der *Eperythrozoon-suis*-Infektion. Tierärztl Prax 1990b; 18: 477-481.

Heinritzi K. Untersuchungen zur Übertragbarkeit von *Eperythrozoon suis*. Tierärztl Umschau 1992; 47: 588-599.

Henderson JP, O'Hagan J, Hawe SM, Pratt MC. Anaemia and low viability in piglets infected with *Eperythrozoon suis*. Vet Rec 1997; 140: 144-146.

Henry SC. Clinical observations on eperythrozoonosis. J Am Vet Med Assoc 1979; 174: 601-603.

Hewicker-Trautwein M, Beineke A. Immunpathologie. In: Allgemeine Pathologie für die Tiermedizin. Baumgärtner W, Gruber A, eds. Stuttgart: Enke Verlag 2011: 222-275.

Hicks CA, Barker EN, Brady C, Stokes CR, Helps CR, Tasker S. Non-ribosomal phylogenetic exploration of Mollicute species: new insights into haemoplasma taxonomy. Infect Genet Evol 2014; 23: 99-105.

Hoelzle K, Grimm J, Ritzmann M, Heinritzi K, Torgerson P, Hamburger A, Wittenbrink MM, Hoelzle LE. Use of recombinant antigens to detect antibodies against *Mycoplasma suis*, with correlation of serological results to hematological findings. Clin Vaccine Immunol 2007a; 14: 1616-1622.

Hoelzle K, Doser S, Ritzmann M, Heinritzi K, Palzer A, Elicker S, Kramer M,

Felder KM, Hoelzle LE. Vaccination with the *Mycoplasma suis* recombinant adhesion protein MSG1 elicits a strong immune response but fails to induce protection in pigs. *Vaccine* 2009; 27: 5376-5382.

Hoelzle LE, Adelt D, Hoelzle K, Heinritzi K, Wittenbrink MM. Development of a diagnostic PCR assay based on novel DNA sequences for the detection of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) in porcine blood. *Vet Microbiol* 2003; 93: 185-196.

Hoelzle LE, Hoelzle K, Ritzmann M, Heinritzi K, Wittenbrink MM. *Mycoplasma suis* antigens recognized during humoral immune response in experimentally infected pigs. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 116-122.

Hoelzle LE, Hoelzle K, Harder A, Ritzmann M, Aupperle H, Schoon HA, Heinritzi K, Wittenbrink MM. First identification and functional characterization of an immunogenic protein in unculturable haemotrophic *Mycoplasmas* (*Mycoplasma suis* HspA1). *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007b; 49: 215-223.

Hoelzle LE, Hoelzle K, Helbling M, Aupperle H, Schoon HA, Ritzmann M, Heinritzi K, Felder KM, Wittenbrink MM. MSG1, a surface-localised protein of *Mycoplasma suis* is involved in the adhesion to erythrocytes. *Microbes Infect* 2007c; 9: 466-474.

Hoelzle LE, Helbling M, Hoelzle K, Ritzmann M, Heinritzi K, Wittenbrink MM. First LightCycler real-time PCR assay for the quantitative detection of *Mycoplasma suis* in clinical samples. *J Microbiol Methods* 2007d; 70: 346-354.

Hoelzle LE. Zur Bedeutung der hämotrophen Mykoplasmen in der Veterinarmedizin unter besonderer Berücksichtigung der *Mycoplasma suis*-Infektion beim Schwein. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 2007; 120: 34-41.

Hoelzle LE. Haemotrophic mycoplasmas: recent advances in *Mycoplasma suis*. *Vet Microbiol* 2008; 130: 215-226.

Hoelzle LE, Felder KM, Hoelzle K. Porcine eperythrozoonosis: from Eperythrozoon suis to Mycoplasma suis. Tierärztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere 2011; 39: 215-220.

Hoelzle LE, Zeder M, Felder KM, Hoelzle K. Pathobiology of Mycoplasma suis. Vet J 2014: 20-25.

Hoffmann R, Saalfeld K. Ausbruch einer *Eperythrozoonose* in einem Schweinemastbestand. Dtsch Tierärztl Wochenschr 1977; 84: 7-9.

Hoffmann R, Schmid DO, Hoffmann-Fezer G. Erythrocyte antibodies in porcine eperythrozoonosis. Vet Immunol Immunopathol 1981; 2: 111-119.

Hsu FS, Liu MC, Chou SM, Zachary JF, Smith AR. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Eperythrozoon suis antibodies in swine. Am J Vet Res 1992; 53: 352-354.

Huang DS, Guan P, Wu W, Shen TF, Liu HL, Cao S, Zhou H. Infection rate of Eperythrozoon spp. in Chinese population: a systematic review and meta-analysis since the first Chinese case reported in 1991. BMC Infect Dis 2012; 12: 171.

Jain D, Kakar S. Approach to Liver Biopsy With Mild or Nonspecific Histologic Findings. In: Liver Pathology. Ferrel L, Kakar S, eds. New York: Demos Medical Publishing 2011: 275-280.

Jannasch C. Klinische Untersuchungen, Blutparameter und Erregerausscheidung von splenektomierten Schweinen nach experimenteller Infektion mit *Mycoplasma suis*. Diss. med. vet. 2014. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Jüngling A, Erhard MH, Heinritzi K, Lösch U. Bedeutung und Verlauf eines Kälteagglutinins bei der *Eperythrozoon suis*-Infektion des Schweines. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 1994; 107: 271-275.

Käufer-Weiss I. Leber und Gallenwege. In: Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. Dahme E, Weiss E, eds. Stuttgart: Enke Verlag 2007: 148-166.

Kinsley A. Protozoan-like body in the blood of swine. Vet Med 1932; 27: 196.

Kinsley ATR, J. D. . Anaplasmosis-like disease in swine. J Am Vet Med Assoc 1934; 84: 891-892.

Kixmüller M. Labordiagnostische Referenzbereiche bei unterschiedlichen Schweinerassen sowie histopathologische und immunhistochemische Untersuchung von Gehirnen älterer Sauen und Eber auf transmissible spongiforme Enzephalopathie im Rahmen der TSE-Studie. Diss. med. vet. 2004. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Korn G, Mussgay M. Ein Fall von *Eperythrozoon suis* mit differentialdiagnostischer Bedeutung bei einem Schweinepestverdacht. Zentralbl Veterinärmed B 1968; 15: 617-630.

Kreier JP, Gothe R. Aegyptianellosis, eperythrozoonosis, grahamellosis and haemobartonellosis. Vet Parasitol 1976; 2: 83-95.

Kreier JP, Ristic M. The biology of hemotrophic bacteria. Annu Rev Microbiol 1981; 35: 325-338.

Lang F, Lang E, Foller M. Physiology and pathophysiology of eryptosis. Transfus Med Hemother 2012; 39: 308-314.

Liebich HG, Heinritzi K. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an *Eperythrozoon suis*. Tierärztl Prax 1992; 20: 270-274.

Looi LM, Cheah PL. In situ hybridisation: principles and applications. Malays J Pathol 1992; 14: 69-76.

Lyon E, Wittwer CT. LightCycler technology in molecular diagnostics. *J Mol Diagn* 2009; 11: 93-101.

Maggi RG, Compton SM, Trull CL, Mascarelli PE, Mozayeni BR, Breitschwerdt EB. Infection with hemotropic *Mycoplasma* species in patients with or without extensive arthropod or animal contact. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 3237-3241.

Messick JB, Cooper SK, Huntley M. Development and evaluation of a polymerase chain reaction assay using the 16S rRNA gene for detection of *Eperythrozoon suis* infection. *J Vet Diagn Invest* 1999; 11: 229-236.

Messick JB, Smith G, Berent L, Cooper S. Genome size of *Eperythrozoon suis* and hybridization with 16S rRNA gene. *Can J Microbiol* 2000; 46: 1082-1086.

Messick JB. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Vet Clin Pathol* 2004; 33: 2-13.

Mietzner TA, Morse SA. The role of iron-binding proteins in the survival of pathogenic bacteria. *Annu Rev Nutr* 1994; 14: 471-493.

Mischke R. Hämostase. In: *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. Moritz A, ed. Stuttgart: Schattauer GmbH 2013: 197-240.

Moench TR. In situ hybridization. *Mol Cell Probes* 1987; 1: 195-205.

Moritz A, Schwendenwein I, Kraft W. Hämatologie. In: *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*, 7 edn. Moritz A, ed. Stuttgart: Schattauer GmbH 2013a: 79-156.

Moritz A, Schwendenwein I, Kraft W. Harnapparat. In: *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. Moritz A, ed. Stuttgart: Schattauer GmbH 2013b: 420-486.

Mundhenk L, Wohlsein P. Leber, Gallensystem und exokrines Pankreas. In:

Spezielle Pathologie für die Tiermedizin. Baumgärtner W, Gruber A, eds. Stuttgart: Enke Verlag 2015: 75-113.

Museux K, Boretti FS, Willi B, Riond B, Hoelzle K, Hoelzle LE, Wittenbrink MM, Tasker S, Wengi N, Reusch CE, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. In vivo transmission studies of 'Candidatus Mycoplasma turicensis' in the domestic cat. Vet Res 2009; 40: 45.

Neimark H, Kocan KM. The cell wall-less rickettsia *Eperythrozoon wenyonii* is a Mycoplasma. FEMS Microbiol Lett 1997; 156: 287-291.

Neimark H, Johansson KE, Rikihisa Y, Tully JG. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of 'Candidatus Mycoplasma haemofelis', 'Candidatus Mycoplasma haemomuris', 'Candidatus Mycoplasma haemosuis' and 'Candidatus Mycoplasma wenyonii'. Int J Syst Evol Microbiol 2001; 51: 891-899.

Nerbas E. Aktualisierung von Blutparametern beim Schwein Diss. med. vet. 2008. Tierärztliche Hochschule Hannover

Neumann S. Leber. In: Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. Moritz A, ed. Stuttgart: Schattauer GmbH 2013: 250-274.

Nguyen D. Phosphatidylserine exposure in red blood cells: A suggestion for the active role of red blood cells in blood clot formation Diss. rer. nat. 2010. Universität des Saarlandes.

Nonaka N, Thacker BJ, Schillhorn van Veen TW, Bull RW. In vitro maintenance of *Eperythrozoon suis*. Vet Parasitol 1996; 61: 181-199.

Novacco M, Riond B, Meli ML, Grest P, Hofmann-Lehmann R. Tissue sequestration of 'Candidatus Mycoplasma turicensis'. Vet Microbiol 2013; 167: 403-409.

Oehlerking J, Kube M, Felder KM, Matter D, Wittenbrink MM, Schwarzenbach S, Kramer MM, Hoelzle K, Hoelzle LE. Complete genome sequence of the hemotrophic *Mycoplasma suis* strain KI3806. *J Bacteriol* 2011; 193: 2369-2370.

Peteranderl W. Untersuchungen über den Glucose-, Lactat-, und Pyruvatgehalt sowie den Säure-Basenhaushalt im venösen Blut bei der Eperythrozoonose des Schweines. Diss. med. vet. 1988. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Peters IR, Helps CR, McAuliffe L, Neimark H, Lappin MR, Gruffydd-Jones TJ, Day MJ, Hoelzle LE, Willi B, Meli M, Hofmann-Lehmann R, Tasker S. RNase P RNA gene (*rnpB*) phylogeny of Hemoplasmas and other *Mycoplasma* species. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1873-1877.

Peters IR, Helps CR, Willi B, Hofmann-Lehmann R, Gruffydd-Jones TJ, Day MJ, Tasker S. Detection of feline haemoplasma species in experimental infections by in-situ hybridisation. *Microb Pathog* 2011; 50: 94-99.

Pitcher DG, Nicholas RA. *Mycoplasma* host specificity: fact or fiction? *Vet J* 2005; 170: 300-306.

Plank G, Heinritzi K. Disseminierte intravasale Gerinnung bei der Eperythrozoonose des Schweines. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 1990; 103: 13-18.

Pospischil A, Hoffmann R. Eperythrozoon *suis* in naturally infected pigs: a light and electron microscopic study. *Vet Pathol* 1982; 19: 651-657.

Preston KS, Greve JH. Eperythrozoonosis in 4-week-old pigs. *Iowa State Univ Vet* 1965; 27: 119, 127.

Prullage JB, Williams RE, Gaafar SM. On the transmissibility of Eperythrozoon *suis* by *Stomoxys calcitrans* and *Aedes aegypti*. *Vet Parasitol* 1993; 50: 125-135.

Quin AH. A Discussion of some diseases of swine. Can Vet J 1960; 1: 246-250.

Ramos-Vara JA, Miller MA. When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry-the red, brown, and blue technique. Vet Pathol 2014; 51: 42-87.

Rikihisa Y, Kawahara M, Wen B, Kociba G, Fuerst P, Kawamori F, Suto C, Shibata S, Futohashi M. Western immunoblot analysis of *Haemobartonella muris* and comparison of 16S rRNA gene sequences of *H. muris*, *H. felis*, and *Eperythrozoon suis*. J Clin Microbiol 1997; 35: 823-829.

Ritzmann M, Grimm J, Heinritzi K, Hoelzle K, Hoelzle LE. Prevalence of *Mycoplasma suis* in slaughter pigs, with correlation of PCR results to hematological findings. Vet Microbiol 2009; 133: 84-91.

Roche SP, Kobos R. Jaundice in the adult patient. Am Fam Physician 2004; 69: 299-304.

Schilling V. *Eperythrozoon coccoides*, eine neue durch Splenektomie aktionierbare Dauerinfektion der weißen Maus. Klinische Wochenschrift 1928; 7: 1853-1855.

Schoon HA, Ellenberger C, Gruber A. Kreislaufstörungen. In: Allgemeine Pathologie für die Tiermedizin. Baumgärtner W, Gruber A, eds. Stuttgart: Enke Verlag 2011: 140-177.

Schreiner SA, Hoelzle K, Hofmann-Lehmann R, Hamburger A, Wittenbrink MM, Kramer MM, Sokoli A, Felder KM, Groebel K, Hoelzle LE. Nanotransformation of the haemotrophic *Mycoplasma suis* during in vitro cultivation attempts using modified cell free *Mycoplasma media*. Vet Microbiol 2012a; 160: 227-232.

Schreiner SA, Sokoli A, Felder KM, Wittenbrink MM, Schwarzenbach S, Guhl B, Hoelzle K, Hoelzle LE. The surface-localised α -enolase of *Mycoplasma suis* is an adhesion protein. Vet Microbiol 2012b; 156: 88-95.

Schuller W, Heinritzi K, al-Nuktha S, Kolbl S, Schuh M. Serologische Verlaufsuntersuchungen mittels KBR und ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen die *Eperythrozoon-suis*-Infektion des Schweines. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 1990; 103: 9-12.

Semple JW, Milev Y, Cosgrave D, Mody M, Hornstein A, Blanchette V, Freedman J. Differences in serum cytokine levels in acute and chronic autoimmune thrombocytopenic purpura: relationship to platelet phenotype and antiplatelet T-cell reactivity. Blood 1996; 87: 4245-4254.

Sherlock S. Disease of the digestive system. Drugs and the liver. Br Med J 1968; 1: 227-229.

Silbernagel S. Temperatur, Energie. In: Taschenatlas Physiologie. Silbernagel S, Lang F, eds. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG 2013a: 24-28.

Silbernagel S. Magen, Darm, Leber. In: Taschenatlas Pathophysiologie. Silbernagel S, Lang F, eds. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG 2013b: 146-189.

Smith Burt S. Purpura Hemorrhagica, or Morbus Maculosus of Werlhof. Boston Med Surg J 1900; 143: 441-444.

Sokoli A, Groebel K, Hoelzle K, Amselgruber WM, Mateos JM, Schneider MK, Ziegler U, Felder KM, Hoelzle LE. Mycoplasma suis infection results endothelial cell damage and activation: new insight into the cell tropism and pathogenicity of hemotrophic mycoplasma. Vet Res 2013; 44: 6.

Splitter EJ, Williamson RL. Eperythrozoonosis in swine; a preliminary report. J Am Vet Med Assoc 1950; 116: 360-364.

Splitter EJ. Eperythrozoon suis, the etiologic agent of ictero-anemia or an anaplasmosis-like disease in swine. Am J Vet Res 1950a; 11: 324-330.

Splitter EJ. Eperythrozoon suis n. sp. and Eperythrozoon parvum n. sp., 2 new blood parasites of swine. Science 1950b; 111: 513-514.

Splitter EJ. Eperythrozoonosis in swine. Iowa State Univ Vet 1951; 13: 77-81.

Stadler J, Jannasch C, Mack SL, Dietz S, Zols S, Ritzmann M, Hoelzle K, Hoelzle LE. Clinical and haematological characterisation of Mycoplasma suis infections in splenectomised and non-splenectomised pigs. Vet Microbiol 2014; 172: 294-300.

Stalker M, Hayes MA. Liver and biliary system. In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals, 5 edn. Grant Maxie M, ed.: Saunders Elsevier 2007: 297-388.

Stary Z. Leber und Galle. In: Der Stoffwechsel. Lohmann K, ed. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1956: 1-569.

Steer JA, Tasker S, Barker EN, Jensen J, Mitchell J, Stocki T, Chalker VJ, Hamon M. A novel hemotropic Mycoplasma (hemoplasma) in a patient with hemolytic anemia and pyrexia. Clin Infect Dis 2011; 53: 147-151.

Strait EL, Hawkins PA, Wilson WD. Dysgalactia associated with Mycoplasma suis infection in a sow herd. J Am Vet Med Assoc 2012; 241: 1666-1667.

Sykes JE, Lindsay LL, Maggi RG, Breitschwerdt EB. Human coinfection with Bartonella henselae and two hemotropic mycoplasma variants resembling Mycoplasma ovis. J Clin Microbiol 2010; 48: 3782-3785.

Tasker S, Helps CR, Day MJ, Harbour DA, Shaw SE, Harrus S, Baneth G, Lobetti RG, Malik R, Beaufls JP, Belford CR, Gruffydd-Jones TJ. Phylogenetic analysis of hemoplasma species: an international study. J Clin Microbiol 2003; 41: 3877-3880.

Tasker S, Peters IR, Day MJ, Willi B, Hofmann-Lehmann R, Gruffydd-Jones TJ,

Helps CR. Distribution of *Mycoplasma haemofelis* in blood and tissues following experimental infection. *Microb Pathog* 2009; 47: 334-340.

Thacker EL, Minion FC. Mycoplasmosis. In: *Diseases of Swine*. Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, eds. Chichester: John Wiley & Sons, Inc. 2012: 791-793.

Thai PMK. Einfluss der lungenprotektiven Beatmung mit niedrigen Atemzugvolumina in Kombination mit permissiver Hyperkapnie auf die systemische Hämodynamik und die regionale Myokardperfusion bei experimentellem Lungenversagen. Diss. med. 2012. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Thiel W. Zur Pathologie und Diagnostik der Eperythrozooninfektion der Schweine *Prakt Tierarzt* 1983; 64: 692-697.

Uilenberg G, Thiaucourt F, Jongejan F. On molecular taxonomy: what is in a name? *Exp Appl Acarol* 2004; 32: 301-312.

v. Engelhardt W. Kreislauf. In: *Physiologie der Haustiere*, 1 edn. v. Engelhardt W, Breves G, eds. Stuttgart: Enke im Hippokrates Verlag GmbH 2000: 171-189.

Watanabe Y, Fujihara M, Obara H, Nagai K, Harasawa R. Two genetic clusters in swine hemoplasmas revealed by analyses of the 16S rRNA and RNase P RNA genes. *J Vet Med Sci* 2011; 73: 1657-1661.

Watanabe Y, Fujihara M, Suzuki J, Sasaoka F, Nagai K, Harasawa R. Prevalence of swine hemoplasmas revealed by real-time PCR using 16S rRNA gene primers. *J Vet Med Sci* 2012; 74: 1315-1318.

Wiesner E, Fürll M. Morbus maculosus. In: *Lexikon der Veterinärmedizin*. Wiesner E, Ribbeck R, eds. Stuttgart: Enke im Hippokrates Verlag GmbH 2000: 965-966.

Wolf-Jackel GA, Cattori V, Geret CP, Novacco M, Meli ML, Riond B, Boretti FS, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. Quantification of the humoral immune response and hemoplasma blood and tissue loads in cats coinfecting with 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' and feline leukemia virus. *Microb Pathog* 2012; 53: 74-80.

Yuan CL, Liang AB, Yao CB, Yang ZB, Zhu JG, Cui L, Yu F, Zhu NY, Yang XW, Hua XG. Prevalence of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) infection in swine and swine-farm workers in Shanghai, China. *Am J Vet Res* 2009; 70: 890-894.

Zachary JF, Basgall EJ. Erythrocyte membrane alterations associated with the attachment and replication of *Eperythrozoon suis*: a light and electron microscopic study. *Vet Pathol* 1985; 22: 164-170.

Zachary JF, Smith AR. Experimental porcine eperythrozoonosis: T-lymphocyte suppression and misdirected immune responses. *Am J Vet Res* 1985; 46: 821-830.

Zhang CY, Li YF, Jiang P, Chen W. Use of MSG1 protein in a novel blocking ELISA for the detection of *Mycoplasma suis* infection. *Vet J* 2012; 193: 535-538.

Zhuang QJ, Song HQ, Zhu XQ, Fu BQ. Human Infection with Hemoplasma in Mainland China. *J Anim Vet Adv* 2010; 9: 1905-1908.

XI. ANHANG

1. Bewertungsschema („Score-System“) für die klinische Untersuchung

<i>Organ</i>	<i>Score-Punkte</i>	<i>Symptom</i>
Ohrträder	0	keine Veränderungen
	1	geringgradige Zyanosen
	2	moderate Zyanosen bzw. Nekrosen
Haut	0	keine Veränderungen
	1	moderate Blässe
	2	Morbus maculosus
	3	Ikterus
Temperatur	0	< 40°C
	1	40 -42°C
	2	> 42°C
Verhalten	0	ungestört
	1	reduziert
	2	Apathie
Futteraufnahme	0	keine Veränderungen
	1	reduzierte Futteraufnahme
	2	Anorexie
Atmung	0	keine Veränderungen
	1	milde Dyspnoe
	2	starke Dyspnoe
Therapieeinleitung		Score ≥ 3
Abbruchkriterien		keine Besserung nach 48 h trotz antibiotischer Behandlung (gleichbleibend klinischer Score ≥ 3 ; anhaltendes Fieber $\geq 40^{\circ}\text{C}$, gestörte Futteraufnahme, gestörtes Allgemeinbefinden)

2. Probenentnahmeprotokoll der pathologischen Unter-

suchung

Alter:

Gewicht:

Todeszeitpunkt, -art:

Organ	Läsionen: ja / nein Lokalisation, Art	Fixiert	Nativ/ Kryo	Besonderheiten
Dünndarm		x	x	
Dickdarm		x	x	
Magen		x		
Leber (3 Lokalisationen)		3x	x	
Galle			x	Asservieren
Pankreas (Corpus)		x	x	
Pankreas (Duodendal- schenkel)		x		
Pankreas (Milzschenkel)		x		
Lunge (4 Lappen)		4x	4x	
Ovar/Uterus		je 1x	je 1x	
Nebennieren		2x		
Nieren		2x	je 1x	
Gehirn (Großhirn, Kleinhirn)		x	1x GH 1x KH	Tupfer -> BU
Haut		x		
Knochenmark (Femur/Sternum)		x	x	
Herz (RV LV Sept)		3x	x	
Aorta (3 Lokalisationen)		3x	3x	
Vena cava (2 Lokalisationen)		2x	2x	
Lymphknoten (mesenteriales, subiliaci, tracheo bronchiales)		Xx	Xx	
Gelenke (Synovialis)		1x		Synovia -> BU bei Bedarf
Milz (falls Stumpf vorhanden)		x	x	
Thymus		x		
M. triceps				
Urin			x	Asservieren

3. Fixationsmedium

3.1. Paraformaldehyd, 4%ig

10,7 g Dimethylarsinsäure-Natriumsalz-Trihydrat (Merck, Darmstadt, Nr. 8.20670) und 4,15 ml 1 N HCl (neoLab, Heidelberg, Nr. 1040) in 500 ml Aqua dest. lösen und pH-Wert 7,2 einstellen.

500 ml Aqua dest. (80°C) dazu geben, 40 g Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, Nr. 1.04005) und 0,735 g Kalziumchlorid-Dihydrat (Merck, Darmstadt, Nr. 1.02382) darin lösen.

Die Lösung auf einem Magnetrührer (MR 2000, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach) auf 70°C erhitzen, 1 N NaOH (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nr. 35256) zugeben bis die Lösung klar geworden ist. Bei Raumtemperatur abkühlen lassen und pH-Wert 7,2 einstellen. Lagerung bei 4°C.

4. Lösungen für die Kunststoffeinfettung

4.1. Spüllösung

16,5 g Dimethylarsinsäure-Natriumsalz-Trihydrat (Merck, Darmstadt, Nr. 8.20670) und 6,23 ml 1 N HCl (neoLab, Heidelberg, Nr. 1040) in 1500 ml Aqua dest. lösen. Den pH-Wert auf 7,2 einstellen.

105 g Saccharose (VWR International GmbH, Darmstadt, Nr. 27483.294) und 1,105 g Kalziumchlorid-Dihydrat (Merck, Darmstadt, Nr. 1.02382) in die hergestellte Lösung geben. pH-Wert 7,2 einstellen.

4.2. Einbettungsmedium

60 ml Methacrylsäure-2-hydroxyethylester (Merck, Darmstadt, Nr.8.00588), 20 ml Methacrylsäuremethylester (Merck, Darmstadt, Nr. 8.05900), 16 ml Ethylenglykolmonobutylether (Merck, Darmstadt, Nr. 8.01554) und 2 ml Polyethylenglykol 400 (Merck,Darmstadt, Nr. 8.17003) mischen. Anschließend 338 mg Benzoylperoxid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nr. 517909-500G) darin lösen.

5. Lösungen für die Färbung der Paraffinschnitte

5.1. 70%iges Ethanol

7000 ml 96%iges Ethanol (BfB, Offenbach/Main, Nr.0641) und 2600 ml Aqua dest. mischen.

5.2. Hämalaun-Eosin-Färbung

5.2.1. 1%ige HCl-Ethanol-Lösung

7000 ml 96%igem Ethanol (BfB, Offenbach/Main, Nr. 0641) mit 2500 ml Aqua dest. und 100 ml 25%iger Salzsäure (neoLab, Heidelberg, Nr. 5030) mischen.

5.2.2. 0,5%ige HCl-Ethanol-Lösung

100 ml 1%ige HCl-Ethanol-Lösung (Anhang XI.5.2.1.) mit 100 ml 70%igem Ethanol (Anhang IX.3.1.) mischen.

5.2.3. 1%ige Eosin-Lösung

10 g Eosin G (Merck, Darmstadt, Nr. 1.15935) in 1000 ml erhitztem Aqua dest. lösen, 1,5 ml 100%igen Eisessig (AppliChem, Darmstadt, Nr. A0820) zugeben.

Anschließend filtrieren.

6. Lösungen für die Färbung der Kunststoffsnitte

6.1. Hämalaun-Eosin-Phloxin-Färbung

6.1.1. 1%ige HCl-Ethanol-Lösung

7000 ml 96%igem Ethanol (BfB, Offenbach/Main, Nr. 0641) mit 2500 ml Aqua dest. und 100 ml 25%iger Salzsäure (neoLab, Heidelberg, Nr. 5030) mischen.

6.1.2. Stammlösung Eosin

1,0 g Eosin G (Merck, Darmstadt, Nr. 1.15935) in 1000 ml Aqua dest. lösen.

6.1.3. Stammlösung Phloxin

1,0 g Phloxin (Merck, Darmstadt, Nr. 15926) in 1000 ml Aqua dest. lösen.

6.1.4. Eosin-Phloxin-Gebrauchslösung

468 ml 96%iges Ethanol (BfB, Offenbach/Main, Nr. 0641), 30 ml Stammlösung Eosin, 3 ml Stammlösung Phloxin und 2,4 ml 96%iger Essigsäure (AppliChem,

Darmstadt, Nr. A0458) mischen.

Anschließend filtrieren.

6.2. Färbung nach Giemsa

6.2.1. 7%ige Giemsa-Gebrauchslösung

97,5 ml di-Kaliumhydrogenphosphat 13,61 g/l (AppliChem, Darmstadt, Nr. 1.01960) und 2,5 ml Natriumhydrogenphosphat 14,19 g/l (Merck, Darmstadt, Nr. 1.01960) mischen, auf 80°C erwärmen. 7 ml Giemsa-Azur-Eosin-Methylenblaulösung (Merck, Darmstadt, Nr. 1.09204) hinzugeben.

pH-Wert 5,0 einstellen und filtrieren.

6.2.2. 0,5%ige Essigsäure

5ml 100%ige Essigsäure (AppliChem, Darmstadt, Nr. A0820) mit 995 ml Aqua dest. mischen.

7. Lösungen für die Immunhistochemie

7.1. 10 mM Citratpuffer pH 6,0

4,2 g Citronensäure-Monohydrat (neoLab, Heidelberg, Nr. 4345) in 2000 ml Aqua dest. lösen. Mit 2 N NaOH (neoLab, Heidelberg, Nr. 5630) pH-Wert 6,0 einstellen.

7.2. 0,05 M Tris-Buffered Saline (TBS) pH 7,6

60,5 g Tris-Hydroxymethylaminomethan ultrapure (neoLab, Heidelberg, Nr. 5670) in 700 ml Aqua dest. lösen und mit 2 N HCl (neoLab, Heidelberg, Nr. 5150) den pH-Wert 7,6 einstellen. Lösung mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen und pH-Wert überprüfen. 90 g NaCl darin lösen und pH-Wert überprüfen.

Für die Gebrauchslösung 1:10 mit Aqua dest. verdünnen und pH-Wert 7,6 einstellen.

7.3. 1%ige Wasserstoffperoxidlösung

6 ml 30%ige H₂O₂-Lösung (neoLab, Heidelberg, Nr. 1185) mit 174 ml Aqua dest. mischen.

7.4. H₂O₂-DAB-Gebrauchslösung

10 mg 3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid-Dihydrat-Tablette (Biotrend, Köln,

Nr. 4170) in 10 ml Aqua dest. geben und im Dunkeln lösen lassen, filtrieren. Vor Gebrauch mit 1 µl 30%iger H₂O₂-Lösung (neoLab, Heidelberg, Nr. 1185) pro 1 ml DAB-Lösung versetzen.

8. Lösungen für die Färbung mit Acridinorange

8.1. Acridinorange-Stammlösung

1,5 % 3,6-Bis(dimethylamino)-acridin-hydrochlorid und Zinkchlorid-Doppelsalz (Certistain[®], Merck, Darmstadt) in 10 l Aqua dest. lösen.

8.2. Acridinorange-Gebrauchslösung

25 ml Acridinorange-Stammlösung (Anhang XI.8.1.) und 125 ml Aqua bidest. mischen.

9. Geräte

Tabelle 7: Verwendete Geräte mit Herstellerangabe und Gerätetyp, sortiert nach ihrer Nummerierung im Material- und Methodenteil.

Gerät ^x	Gerät	Hersteller	Gerätetyp
1	Taumler	Köttermann GmbH & Co. KG, Uetze/Hänigsen	Modell 4010
2	Entwässerungsautomat	Bavimed Laborgeräte GmbH, Birkenau	Histomaster Modell 2050/Di
3	Entwässerungsautomat	Shandon GmbH, Frankfurt	Citadel 1000
4	Paraffineinbettungs- System	MEDITE GmbH, Burgdorf	TES 99
5	Rotationsmikrotom	MICROM International GmbH, Berlin	HM 315
6	Hartschnitt- Rotationsmikrotom	MICROM International GmbH,	HM 360

		Berlin	
7	Streckbad	Daglef Patz KG, Wankendorf	
8	Trockenschrank	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach	
9	Heizplatte	Axel Johnson Lab System, New York, USA	

XII. DANKSAGUNG

Ein ganz besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Mathias Ritzmann. Danke für die Unterstützung bei meiner Doktorarbeit und darüber hinaus, für ein immer offenes Ohr und natürlich für so manches gerecht geteilte Nutellaglas.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Frau Dr. Julia Stadler bedanken, die mich trotz Babypause immer tatkräftig unterstützt, beraten und motiviert und die Arbeit von der Planung bis zur Abgabe engagiert und zuverlässig betreut hat.

Bei Herrn Prof. Dr. Walter Hermanns aus dem Institut für Tierpathologie der LMU München möchte ich mich für die unermüdliche Unterstützung und sein unglaubliches Engagement bei der histopathologischen und immunhistochemischen Untersuchung sowie für die Erstellung der Abbildungen bedanken.

Ein großer Dank auch an Herrn Dr. Ludwig Hölzle und Frau Dr. Katharina Hölzle aus dem Institut für Nutztierwissenschaften, Fachgebiet Infektions- und Umwelthygiene bei Nutztieren der Universität Hohenheim für die Durchführung und Auswertung der real-time PCR sowie die fachliche Unterstützung bei der Versuchsdurchführung und dem Anfertigen der Doktorarbeit.

Dr. Martin Langenmayer aus dem Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen der LMU München danke ich für die Unterstützung bei der Sektion und dass er mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Bei den Tierpflegern der Klinik für Schweine Gino, Ebru und Sven möchte ich mich ganz herzlich für die aufmerksame Pflege meiner Versuchstiere und ihre Hilfe im Stall bedanken.

Vielen Dank natürlich auch meinen wundervollen Kollegen an der Klinik für Schweine. Ohne euch wäre die Doktorarbeitszeit nicht mal halb so lustig, bereichernd, verrückt und ereignisreich gewesen. Danke für die vielen schönen Stunden in der Klinik, bei Ausfahrten oder am See, die Grillabende, die legendären Kabu's und so vieles mehr!

Einen Riesendank auch an Flo, nicht nur für die tatkräftige Unterstützung bei Probennahmen, Übersetzungen, Nikositting und co., sondern vor allem dafür, dass

du mich auch in Zeiten größten Hungers und Stress erträgst und dabei nie die gute Laune verlierst.

Mein größter Dank geht natürlich an meine Familie. Ohne euch würde ich niemals da stehen wo ich heute bin. Danke dass ihr mich immer uneingeschränkt und bedingungslos unterstützt, bestärkt und an mich geglaubt habt.

Zuletzt möchte ich mich noch bei Püppi, Wutzelchen und Kollegen bedanken. Ohne sie wären diese Seiten leer.